

HOVEDFAGSOPPGAVE I FARMAKOLOGI FOR GRADEN CAND. PHARM.

**Kvantifisering av glukokortikoider og mykofenolat i
humant plasma ved egenutviklet LC-MS/MS-metode**



Ingjerd Sæves

Utført ved:

Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi

Avdeling for medisinsk biokjemi, Rikshospitalet

Farmasøytisk institutt, Det matematisk-vitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Høsten 2007

Forord

Denne hovedfagsoppgaven har blitt til ved Seksjon for analytisk farmakologi og endokrinologi (SAFE), Avdeling for medisinsk biokjemi, ved Rikshospitalet i tidsrommet november 2006 til oktober 2007. Denne oppgaven er et delprosjekt i forskningsprosjektet "Individuell immunmodulering" (I²M). Veiledere for denne oppgaven har vært cand.pharm. og stipendiat Nils Tore Vethe og professor Stein Bergan.

Nils Tore, tusen takk for all hjelp! Du har vært en meget tålmodig, engasjert og god veileder, som alltid har stilt opp og hjulpet til.

Stein, takk for at du er så positiv og alltid tar deg tid til å hjelpe, svare på spørsmål og gi god veiledning! Dere har begge gjort dette til et flott og lærerikt år!

Takk til stipendiat Sara Bremer og mastergradsstudent Tore Jakob Meltevik, for mange hyggelige kopper kaffe og faglige diskusjoner. Til resten av I²M-gruppen: Helge Rootwelt, Randeep Mandla, Else Brodtkorb og Ragnhild Heier Skauby, takk for hyggelig samarbeid.

En stor takk rettes også til bioingeniørene ved SAFE, med Laila Gjerdalen i spissen. Det er alltid så hyggelig å være på laben med dere! Mange trivelige kaffepauser har det også blitt. Jeg vil også takke Thai Tran for mye god hjelp.

Takk til professor Anders Åsberg, ved Farmasøytisk Institutt, for jobben du har gjort som internveileder.

Til slutt, takk til familie og venner som interessert har fulgt med på hvordan det går med oppgaven.

Rikshospitalet, oktober 2007.

Innhold

FORORD	2
INNHold.....	3
SAMMENDRAG	5
FORKORTELSER.....	7
1. BAKGRUNN.....	9
1.1 GENERELT OM TRANSPLANTASJONSMEDISIN	9
1.1.1 Transplantasjon.....	9
1.1.2 Rejeksjon.....	9
1.1.3 Immunsuppressiv behandling.....	10
1.2 GLUKOKORTIKOIDER OG MYKOFENOLAT	11
1.2.1 Kortikosteroider	11
1.2.2 Terapeutisk anvendelse.....	12
1.2.3 Strukturaktivitet.....	14
1.2.4 Farmakodynamikk - glukokortikoider	15
1.2.5 Farmakokinetikk - glukokortikoider.....	17
1.2.6 Farmakodynamikk – mykofenolat (MPA).....	19
1.2.7 Farmakokinetikk – mykofenolat (MPA).....	20
1.3 BIOANALYSE	20
1.3.1 Prøveopparbeidelse.....	20
1.3.2 Kromatografi.....	21
1.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	22
1.3.4 Hydrofil interaksjonskromatografi (HILIC).....	23
1.3.5 Massespektrometri (MS) - generelt	24
1.3.6 Elektrosprayionisering (ESI)	25
1.3.7 Tandem-massespektrometri (MS/MS)	25
1.3.8 Monitoreringsteknikker.....	26
1.3.9 Matrikseffekter	27
2. HENSIKT	28
3. MATERIALER OG METODER.....	29
3.1 ANALYTTER, KJEMIKALIER OG UTSTYR.....	29
3.2 TILLAGING AV LØSNINGER OG MOBILFASE	30
3.2.1 Mobilfase	30
3.2.2 Stamlløsninger og fellingsreagens	30
3.2.3 Kalibratorer og kontroller	31
3.3 PRØVEMATERIALE	31
3.4 UTVIKLING AV LC-MS/MS-METODE FOR GLUKOKORTIKOIDER OG MYKOFENOLAT.....	32
3.4.1 Intern standard.....	32
3.4.2 Tuning	33
3.4.3 Ioniseringsteknikk.....	34
3.4.4 Kolonner	34
3.4.5 Mobilfase	35
3.4.6 Carry-over.....	35

3.4.7 Interferenser.....	36
3.4.8 Matrikseffekter	36
3.5 PRØVEOPPARBEIDELSE.....	37
3.6 VALIDERING	40
3.6.1 Introduksjon	40
3.6.2 Kalibreringsmodell.....	40
3.6.3 Presisjon	41
3.7 DATABEHANDLING	41
4. RESULTATER.....	42
4.1 BETINGELSER I LC-MS/MS	42
4.1.1 Intern standard.....	42
4.1.2 Tuning	42
4.1.3 Ioniseringsteknikk.....	43
4.1.4 Mobilfase og kolonne.....	43
4.1.5 Matrikseffekter	46
4.1.6 Interferenser og carry-over.....	48
4.1.7 Vaske- og skylleprosedyrer.....	48
4.2 PRØVEOPPARBEIDELSE.....	49
4.3 RESULTATER AV PASIENTPRØVER/DOSEINTERVALL.....	52
4.4 VALIDERING	55
4.4.1 Kalibreringsmodell.....	55
4.4.2 Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ)	55
4.4.3 Presisjon	56
5. DISKUSJON	57
5.1 STRATEGI FOR METODEUTVIKLINGEN	57
5.2 BETINGELSER I LC-MS/MS	58
5.3 PRØVEOPPARBEIDELSE.....	60
5.4 PASIENTPRØVER	61
5.5 VALIDERING	62
5.5.1 Kalibreringsmodell.....	62
5.5.2 Presisjon	65
5.5.3 Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ)	66
5.5.4 Interferenser og carry-over.....	67
5.6 ANNET	68
5.6.1 Hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase (HSD11B).....	68
5.6.2 Kortisolfritt plasma	68
5.6.3 Inkludering av mykofenolat i metoden.....	69
5.6.4 Sensitivitet.....	70
5.6.5 Videre planer.....	70
6. KONKLUSJON	72
LITTERATURLISTE	73
VEDLEGG 1.....	76
VEDLEGG 2.....	81
VEDLEGG 3.....	82

Sammendrag

Etter transplantasjon av celler, vev eller organer, er det alltid en risiko for rejeksjon. Ved rejeksjon avstøtes det transplanterte vevet eller organet på grunn av en immunreaksjon hos mottakeren. Dette fører til at transplantatet etter en tid opphører å fungere, og brytes ned. For å unngå rejeksjon er det nødvendig å hemme mottakers immunsystem, og dette gjøres med immunsuppressiv behandling. Det finnes en rekke immunsuppressive legemidler på markedet, og behandlingen foregår etter bestemte behandlingsprotokoller.

Glukokortikoider og mykofenolat utgjør en sentral del av de fleste immunsuppressive behandlingsregimer. På bakgrunn av dette skal det i denne hovedfagsoppgaven utvikles en LC-MS/MS-metode for å kvantifisere glukokortikoider og mykofenolsyre (MPA) i humant plasma. Et av formålene med å utvikle denne metoden er i senere studier å undersøke aktiviteten av de to isoenzymene hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 og 2 (HSD11B1 og HSD11B2), som spiller en viktig rolle i aktivering og inaktivering av glukokortikoider in vivo. Siden de fleste transplanterte pasienter i dag står på et doseringsregime bestående av både glukokortikoider og mykofenolat, kan det være hensiktsmessig også å inkludere MPA i den samme analysemetoden som glukokortikoidene.

Analysemetoden baserer seg på bruk av væskechromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS). Kromatografisk separasjon skjer ved hjelp av HILIC-prinsippet (hydrofil interaksjonskromatografi). Mobilfasen som benyttes er en gradient av 95 % acetonitril og vann bufret med 10 mM ammoniumacetat og 0,2 % maursyre. Med denne gradienten separeres analyttene fra øvrige matrikskomponenter, og total analysetid per prøve er 6 minutter. Flumetason og prednisolon-*d6* er valgt som interne standarder.

Positiv elektrosprayionisering (ESI+) brukes som ioniseringsteknikk, og protonerte molekyllioner $[M+H]^+$ brukes til monitorering, med unntak av MPA, der ammoniumadduktet brukes. Monitoreringsteknikken baserer seg på MRM (multippel reaksjonsmonitorering).

Prøveopparbeidelsen består av proteinfelling med acetonitril og væske-væske-ekstraksjon med diklormetan. Etter ekstraksjonen dampes prøvene til tørrhet under nitrogen, og løses på nytt i acetonitril.

Innen-serie- og mellom-serie-presisjon for hver av analyttene ble evaluert i en pool av pasientprøver, som ble fortynnet til tre ulike konsentrasjonsnivåer. Innen-serie-presisjonen var for de fleste analyseseriene akseptabel. For en del av analyseseriene, da spesielt ved de laveste konsentrasjonene, var variasjonskoeffisienten for høy. Når det gjelder mellom-serie-presisjonen var også variasjonskoeffisienten for høy, og må forbedres.

Ved hovedfagets slutt er ikke metoden ferdig utviklet. Foreløpig ser metoden lovende ut for kvantifisering av glukokortikoider. Til tross for at nedre kvantifiserbare grense (LLOQ) ikke er bestemt ennå, ser det ut til at alle glukokortikoidene er målbare og kvantifiserbare ved analyse av pasientprøver. Noe som tyder bra, da pasientprøver gjenspeiler klinisk relevante konsentrasjoner som det senere er aktuelt å måle. Men enkelte parametere bør optimaliseres, før en full validering gjennomføres. Hvorvidt metoden er egnet til å analysere MPA er fortsatt noe usikkert, men det skal jobbes det videre med.

Forkortelser

ACN – Acetonitril

ACTH – Adrenokortikotropt hormon

AP-1 – Activator Protein 1

APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization

ASTED – Automated Sequential Trace Enrichment of Dialysates

CBG – Kortikosteroidbindende globulin (Corticosteroid Binding Globulin)

CRH – Kortikotropinfrigjørende hormon (Corticotropin Releasing Hormone)

CV – Variasjonskoeffisient (Coefficient of Variation)

DNA – Deoksyribonukleinsyre

ESI – Elektrospray-ionisering

GC – Gasskromatografi

GC-MS – Gasskromatografi koblet til massespektrometri

GR – Glukokortikoidreseptor

GRE – Glukokortikoid-responsivt element

HCl – Saltsyre

HILIC – Hydrofil Interaksjonskromatografi (Hydrophilic Interaction Chromatography)

HLA – Human Leukocyte Antigene

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

HSD11B1 – Hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 1

HSD11B2 – Hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 2

IgG – Immunglobulin G

IMP – Inosin-5'-monofosfat

IMPDH – Inosin – 5'-monofosfat-dehydrogenase

LC-MS – Væskeskromatografi koblet til massespektrometri

LC-MS/MS – Væskeskromatografi koblet til tandem-massespektrometri

LLE – Væske-væske-ekstraksjon (Liquid Liquid Extraction)

LLOQ – Nedre kvantifiseringsgrense (Lower Limit of Quantification)

MHC – Major Histocompatibility Complex

MMF – Mykofenolatmofetil

MPA – Mykofenolsyre

MR – Mineralkortikoidreseptor

MRM – Multiple Reaction Monitoring

MS – Massespektrometri

MS/MS – Tandem-massespektrometri

M_w – Molekylvekt

NAD – Nikotinamid-adenin-dinukleotid

NaOH – Natriumhydroksid

NF- κ B – Nuclear Factor- κ B

PRPP – Fosforibosyl pyrofosfat

Q1 – Første kvadrupol

Q2 – Andre kvadrupol (kollisjonscelle)

Q3 – Tredje kvadrupol

RNA - ribonukleinsyre

Rpm – Rotasjoner per minutt

S/N-ratio – Signal-til-støy-forhold (Signal to Noise Ratio)

SPE – Fast-fase-ekstraksjon (Solid Phase Extraction)

SRM – Selected Reaction Monitoring

TIC – Total Ion Current

TNF- γ – Tumor nekrosefaktor γ

ULOQ – Øvre kvantifiseringsgrense (Upper Limit of Quantification)

XMP – Xanthosin-5'-monofosfat

1. Bakgrunn

1.1 *Generelt om transplantasjonsmedisin*

1.1.1 Transplantasjon

Med transplantasjon menes overføring av celler, vev eller organer fra ett individ til et annet. Det finnes forskjellige typer transplantasjoner: autotransplantasjon, isotransplantasjon, allotransplantasjon og xenotransplantasjon. Ved autotransplantasjon flyttes celler eller vev fra ett sted til et annet innen samme individ. Ved isotransplantasjon er giver og mottaker genetisk identiske. Et eksempel på dette er eneggede tvillinger. En xenotransplantasjon innebærer at giver og mottaker er forskjellige arter. Innen human medisin er allotransplantasjon en viktig behandlingsform. Her er giver og mottaker innen samme art, men genetisk forskjellige. Dette innebærer at immunreaksjoner og rejeksjon av transplantatet er et betydelig problem. Allotransplantasjoner blir benyttet som behandlingsform ved visse typer organsvikt, kreft og hematologiske sykdommer. Vanlige typer transplantasjoner i denne sammenheng er transplantasjon av nyre, hjerte, lunge, lever, pankreas og stamceller (1).

1.1.2 Rejeksjon

Allotransplantasjoner medfører alltid en risiko for rejeksjon. Ved rejeksjon avstøtes det transplanterte vevet eller organet på grunn av immunreaksjon hos mottakeren. Dette fører til at transplantatet etter en tid opphører å fungere og brytes ned.

De immunologiske mekanismene som gir opphav til rejeksjon hos mottaker forårsakes av alloantigener på transplantatet. Dette er makromolekyler, oftest proteiner, som er polymorfe, og varierer fra individ til individ. Disse forskjellene i antigenet vil trigge en immunrespons hos mottakeren, som ikke er tolerant for denne antigendeterminanten.

MHC-molekylene (Major Histocompatibility Complex) og A- og B-antistoffene i ABO-blodtypesystemet er eksempler på alloantigener som må tas hensyn til ved transplantasjon. Hos mennesker kalles MHC-molekylene for HLA-molekyler (humane leukocyte antigene). HLA-antigenene varierer mye mellom individer, noe som medfører at ved de fleste transplantasjoner blir mottaker immunisert med fremmede HLA-molekyler. T-cellene reagerer i stor grad på fremmede HLA-molekyler, noe som ved normal funksjon er med på å beskytte kroppen mot fremmede mikroorganismer og lignende (1).

Valg av donor skjer ut ifra HLA-forlikelighet og ABO-forlikelighet med mottaker. Best mulig tilpasning av givers HLA-molekyler til mottakers har betydning for risikoen for avstøtningsreaksjoner. Ved nyretransplantasjoner kan man ofte oppnå dette ved å velge et familiemedlem som levende donor. Dersom dette ikke er mulig, kan man transplantere en nekronyre fra en nylig avdød person. Alle pasienter som venter på en nekronyre i Norden er registrert i Scandiatransplant. Donorer av nekronyrer vil da bli HLA-typet, og de mottakere i registeret som passer best kan bli prioritert (ved siden av andre kriterier) (1).

Avstøtningsreaksjonene kan klassifiseres som hyperakutte, akutte eller kroniske, avhengig av hvor lang tid det tar før de utvikles. Hyperakutt reaksjon forårsaker vevsskade innen minutter til timer, akutt reaksjon innen 5-7 dager, mens transplantatet vil ved en kronisk reaksjon angripes over lengre tid (1).

1.1.3 Immunsuppressiv behandling

For å unngå reaksjon er det ved transplantasjoner nødvendig å hemme mottakers immunsystem. Med immunsuppressiv behandling er det ønskelig å hemme aktiveringen av B- og T-cellene selektivt, siden disse spiller en viktig rolle i immunresponsen mot fremmede antigener. Målet er å oppnå en stabil toleranse hos mottakeren for transplantatet, og samtidig ha motstandskraft mot infeksjoner og kreftutvikling (2).

Immunsuppressive legemidler som brukes ved transplantasjon kan deles inn i følgende klasser:

- Antiproliferative immunsuppressiva (azatioprin og mykofenolat)
- Glukokortikoider (prednisolon og metyprednisolon)
- Kalsinevrinhemmere (ciklosporin og takrolimus)
- mTOR-hemmere (sirolimus og everolimus)
- Antistoffer (monoklonale som basiliximab og daclizumab m.fl., samt polyklonale som antitymocyttglobulin)

Ved transplantasjoner er målet med immunsuppresjon å unngå reaksjon. Det er derfor viktig å tilpasse dosene av de immunsuppressive legemidlene slik at effekten er tilstrekkelig og risikoen for infeksjoner, malignitet og medikament-spesifikke bivirkninger blir minimalisert. Denne balansen kan oppnås ved å bruke flere legemidler samtidig, da dette kan gi en additiv

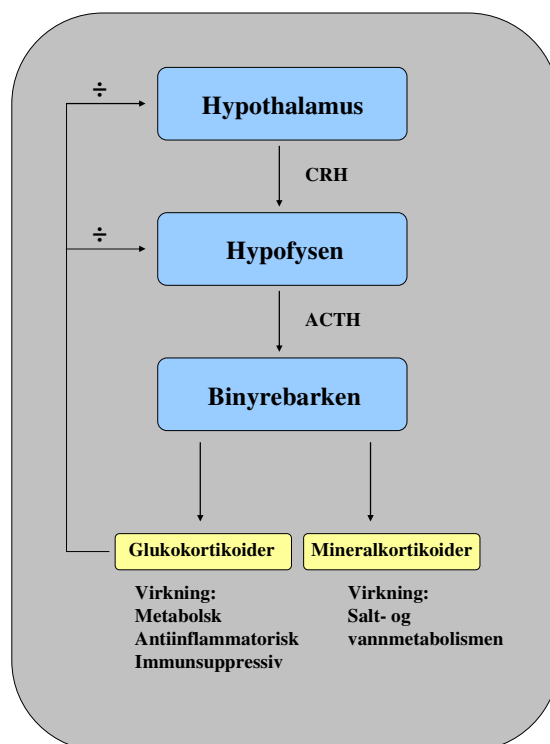
eller synergistisk effekt. Pasienten får da tilstrekkelig immunsuppresjon, samtidig som dosen av hvert enkelt legemiddel reduseres. Farmakologisk monitorering av legemiddelkonsentrasjoner er et nyttig verktøy for å individualisere behandlingen, slik at pasienten oppnår riktig grad av immunsuppresjon. Dette skjer i henhold til fastsatte behandlingsprotokoller. Et eksempel på en slik behandlingsprotokoll er protokollen som brukes ved levertransplantasjon. Denne er utarbeidet av Kirurgisk Klinikk ved Rikshospitalet (3). I denne benyttes en trippelbehandling av glukokortikoider, takrolimus og mykofenolatmofetil. Under selve operasjonen administreres metylprednisolon intravenøst. Dagen etter operasjonen startes behandling med prednisolon peroralt, med en døgndose på 80 mg, som trappes gradvis ned over tid. I tillegg får pasienten mykofenolatmofetil og takrolimus, der doseringen blir tilpasset ved hjelp av farmakologisk monitorering.

1.2 Glukokortikoider og mykofenolat

1.2.1 Kortikosteroider

Kortikosteroider er en gruppe steroidhormoner som produseres i binyrebarken.

Kortikosteroidene kan deles inn i glukokortikoider og mineralkortikoider, avhengig av hvilken type aktivitet de har. Glukokortikoidene regulerer karbohydratmetabolismen, mens mineralkortikoidene virker inn på elektrolyttbalansen. Biosyntesen av kortikosteroider i binyrebarken reguleres av adrenokortikotropt hormon (ACTH) fra hypofysen, som igjen reguleres av corticotropin-frigjørende hormon (CRH) fra hypothalamus. Økt konsentrasjon av kortisol vil i neste omgang hemme produksjon og sekresjon av CRH og ACTH fra hypothalamus og hypofysen gjennom en negativ tilbakekoblingsmekanisme. Reguleringen av kortikosteroidsyntesen er gjengitt i figur 1-1.



Figur 1-1. Regulering av kortikosteroidsyntese.

Kortikosteroidene har en rekke forskjellige effekter. Glukokortikoidene har innvirkning på metabolismen av karbohydrater, proteiner og lipider, mens mineralkortikoidene er viktige for å opprettholde væske- og elektrolyttbalansen. Glukokortikoid og mineralkortikoid aktivitet er ikke nødvendigvis helt separert fra hverandre for en del steroider. Noen glukokortikoider har også mineralkortikoid effekt. Andre viktige effekter er på hjerte- og karsystemet, immunsystemet, nyrene, skjelettmuskulatur, det endokrine systemet og nervesystemet. I tillegg spiller de en viktig rolle i kroppens stressrespons (4).

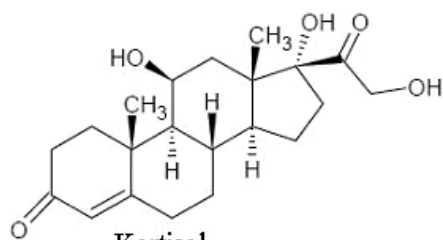
1.2.2 Terapeutisk anvendelse

I terapeutisk sammenheng utnyttes først og fremst den anti-inflammatoriske og immunsuppressive aktiviteten til glukokortikoidene, men de brukes også ved enkelte maligne sykdommer og som erstatningsterapi ved Addisons sykdom. De vanligste indikasjonene for glukokortikoider er astma og allergi, autoimmune sykdommer som revmatisme og hemolytisk anemi, ved inflammatoriske tilstander i hud, øyne øre og nese, og som reaksjonsprofylakse etter allogen organtransplantasjon (4).

Disse steroidene har ved langvarig, systemisk bruk en rekke bivirkninger som bør tas hensyn til ved oppstart av steroidbehandling. Lavest mulig vedlikeholdsdose bør tilstrebes. Noen av bivirkningene er nedsatt immunrespons ved infeksjoner, osteoporose, Cushing-liknende symptomer, metabolske bivirkninger, veksthemming hos barn og binyrebarksuppresjon. Sistnevnte er viktig å ta hensyn til ved seponering av behandlingen (4).

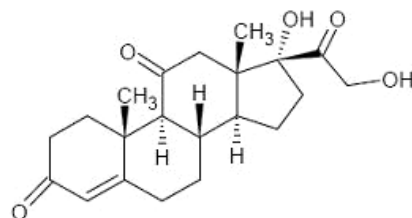
Mykofenolatmofetil brukes i kombinasjon med kalsinevrinhemmere og glukokortikoider som profylakse mot rejeksjon etter transplantasjon.

1.2.3 Strukturaktivitet



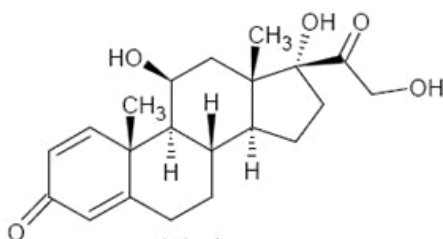
Kortisol

Mw=362,4



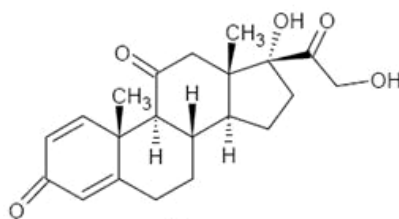
Kortison

Mw=360,4



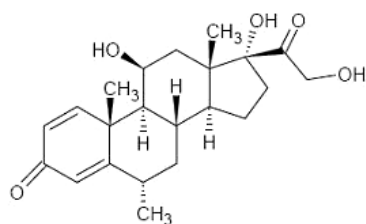
Prednisolon

Mw=360,4



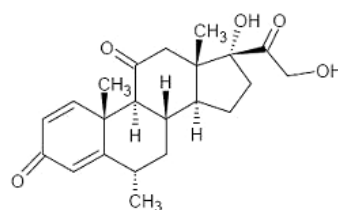
Prednison

Mw=358,4



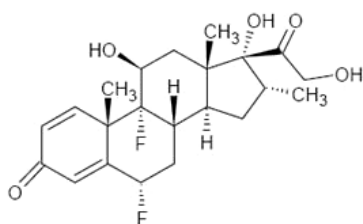
Metylprednisolon

Mw=374,4



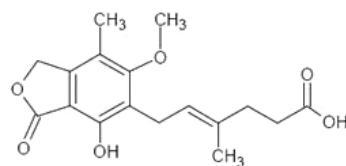
Metylprednison

Mw=372,4



Flumetason

Mw=410,5

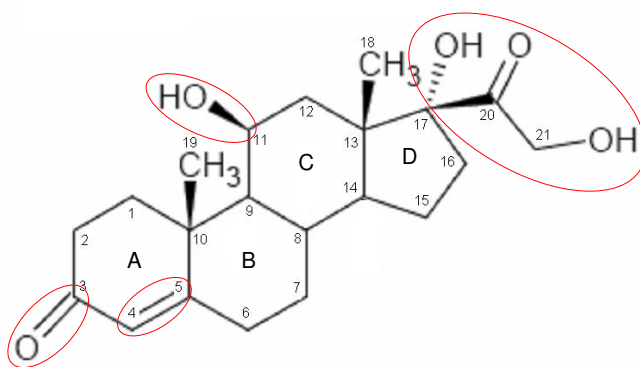


Mykofenolat

Mw=320,3

Figur 1-2. Oversikt over analyttene og deres molekylvekt.

Av de endogene glukokortikoidene er det kortisol som er av størst betydning. Kortisol er kjemisk identisk med hydrokortison, men de to forskjellige navnene brukes for å skille mellom om steroidet er henholdsvis endogent produsert eller tilført i farmakologiske doser (5). Kortisol har både glukokortikoid og mineralkortikoid aktivitet. For å utvikle legemidler med høyere glukokortikoid effekt i forhold til den mineralkortikoide, har det blitt gjort kjemiske modifikasjoner på kortisolmolekylet. Disse endringene har ført til glukokortikoider som er mer potente, med lenger virketid og hvor den mineralkortikoide effekten er minimal. Dobbeltbindingen i 4,5-posisjon og 3-ketogruppen på A-ringene er nødvendig for både glukokortikoid og mineralkortikoid aktivitet. 11 β -hydroksylgruppen på C-ringene er viktig for glukokortikoid aktivitet, men ikke nødvendig for mineralkortikoid aktivitet. 17 α -hydroksylgruppen er en substituent som ikke er nødvendig for glukokortikoid effekt, men som optimaliserer den. En dobbeltbinding i 1,2-posisjon, som finnes i for eksempel prednisolon, øker den glukokortikoide effekten selektivt. Denne dobbeltbindingen fører også til at disse steroidene metaboliseres langsommere enn kortisol. En 6 α -metylering av prednisolon, til metylprednisolon, gir økt glukokortikoid effekt og noe lavere mineralkortikoid effekt sammenlignet med prednisolon (4). Analyttens struktur og molekylvekt er gjengitt i figur 1-2, mens nummerering av steroider er vist i figur 1-3.

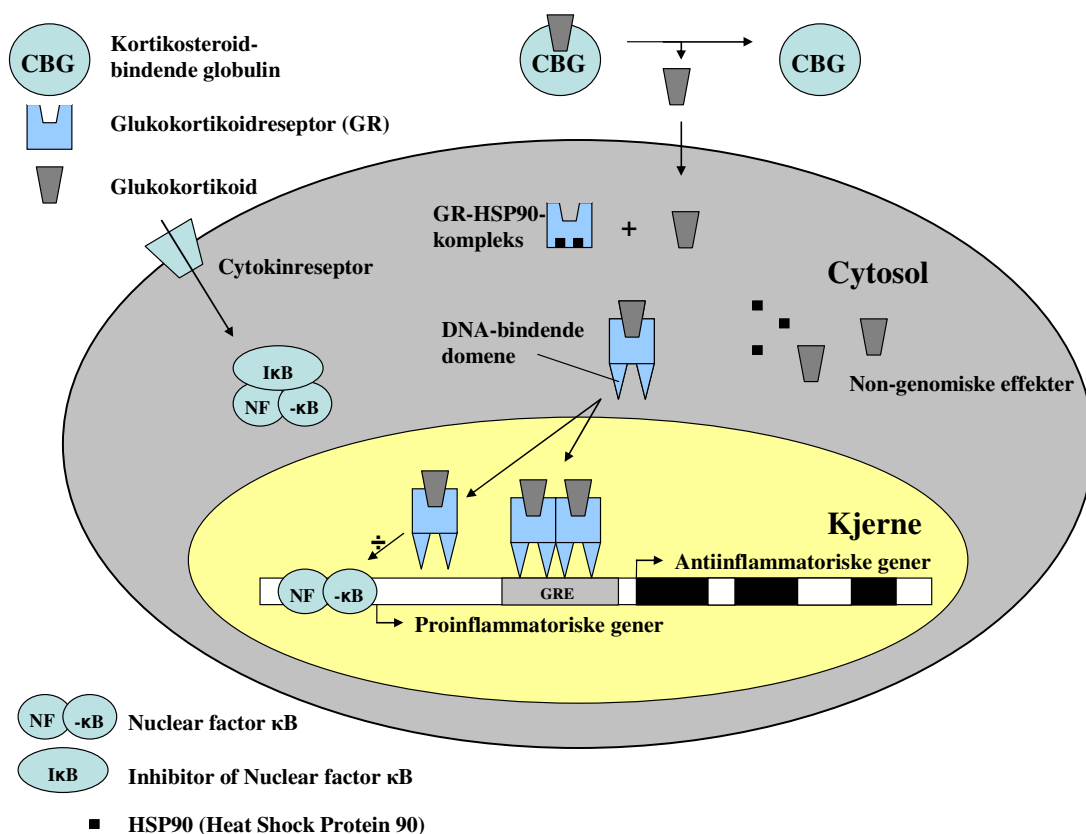


Figur 1-3. Nummerering av steroider

1.2.4 Farmakodynamikk - glukokortikoider

Virkningsmekanismen til glukokortikoidene baserer seg på interaksjoner mellom steroidene og glukokortikoidreseptoren. Glukokortikoidreseptoren er en intracellulær reseptor, som tilhører kjernereseptor-superfamilien. Binding mellom steroid og reseptor fører til en konformasjonsendring av reseptoren. Et DNA-bindende domene vil da komme frem og den

vil være i stand til å binde seg til DNA. Steroidreseptorkomplekset dimeriserer og translokeres deretter inn i kjernen, og binder seg til et glukokortikoid-responsivt element (GRE) i promoterområdet for antiinflammatoriske gener, og regulerer ekspresjonen av kortikosteroid-responsive gener. Effekten av dette er at transkripsjonen av de aktuelle genene enten blir undertrykket eller induisert (4). Undertrykkelse av transkripsjon skjer ved hemming av transkripsjonsfaktorer som AP-1 og NF- κ B. Disse faktorene skrur vanligvis på genene for cyklooksygenase-2 og ulike cytokiner. Glukokortikoider induserer dannelsen av annexin-1 (tidligere lipocortin-1), som er viktig for den negative tilbakekoblingsmekanismen til glukokortikoider på hypofysen. Disse endringene i genekspresjon og proteinsyntese tar tid, og den kliniske effekten av steroidene inntreffer derfor ikke før etter noen timer (6). Cellulær virkningsmekanisme for glukokortikoider er vist i figur 1-4.



Figur 1-4. Virkningsmekanisme for glukokortikoider på cellulært nivå.

Effektene av glukokortikoidene kan deles inn i metabolske og regulatoriske. De har innvirkning på metabolismen av karbohydrater, proteiner og lipider. Glukokortikoidene har en motsatt effekt av insulin, og fører derfor til økt glukosekonsentrasjon i blodet. Opptaket og forbruket av glukose reduseres, og glukoneogenesen øker. Det skjer også en økning i proteinkatabolismen og lipolysen for å forsyne glukoneogenesen med aminosyrer og glyserol. I tillegg til lipolyse, vil glukokortikoidene også føre til en redistribusjon av fett (4).

I tillegg til den metabolske virkningen av glukokortikoidene, har de effekt på inflammatoriske og immunologiske mediatorer og celler, samt på det vaskulære systemet og på hypothalamus og hypofysen. Steroidenes effekt på immunsystemet innebærer:

- Nedgang i produksjon og aktivitet av cytokiner, som for eksempel interleukiner, TNF- γ , granulocyt-makrofag-stimulerende faktor.
- Redusert produksjon av eikosanoider
- Redusert produksjon av IgG
- Redusert produksjon av komplementkomponenter i blodet
- Nedsatt tilstrømming og aktivitet av leukocytter ved akutt inflammasjon
- Nedsatt aktivitet av mononukleære celler og proliferasjon av blodkar, samt mindre fibrose ved kronisk inflammasjon
- Nedsatt klonespansjon av T- og B-celler og nedsatt aktivitet av cytokinutskillende T-celler (6).

Som resultat av dette skjer en redusert frigivelse av vasoaktive og kjemoattraktive faktorer, svekket sekresjon av lipolytiske og proteolytiske enzymer, nedsatt tilstrømming av leukocytter til skadete områder og redusert fibrose. Glukokortikoidene hemmer dermed produksjonen av faktorer som er viktige for å generere en immunrespons (4).

1.2.5 Farmakokinetikk - glukokortikoider

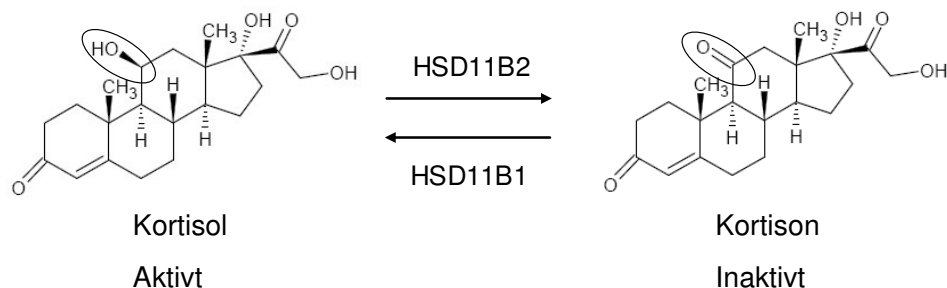
Glukokortikoider kan gis via en rekke administrasjonsveier. De fleste av steroidene er aktive når de gis peroralt. Det er også vanlig at de blir gitt intravenøst, intramuskulært, intraartikulært, pulmonært, som øye- eller nesedråper, eller som kremer og salver til bruk på huden.

Etter oral administrasjon absorberes glukokortikoidene godt, og har en biotilgjengelighet på 60-100 %. Farmakokinetikken til kortisol og prednisolon er ikke lineær. Begge binder seg til

kortikosteroid-bindende globulin (CBG) og albumin. CBG har høy affinitet, men lav kapasitet for binding av kortisol og prednisolon, mens albumin har lav affinitet og høy kapasitet. Dette fører til en økt fri fraksjon med glukokortikoider når CBG mettes, ved konsentrasjoner på rundt 400 µg/L. Dette er en konsentrasjon som oppnås etter doser på 20 mg. Det er kun fri fraksjon av steroidene som kan interagere med reseptor. Metylprednisolon har ingen affinitet til CBG, og bindes kun til albumin (5).

Reduksjon av dobbeltbindingen i 4,5-posisjon skjer både utenfor og i leveren, og resulterer i inaktive forbindelser. Reduksjon av ketogruppen i 3-posisjon til tetrahydrokortisol, skjer kun i lever. Sulfat- eller glukuronidgrupper kan konjugeres til 3-hydroksylgruppen. Dette er reaksjoner som skjer enzymatisk hovedsakelig i lever, men også i nyrene. Disse sulfaterne og glukuronidene skilles ut renalt (4).

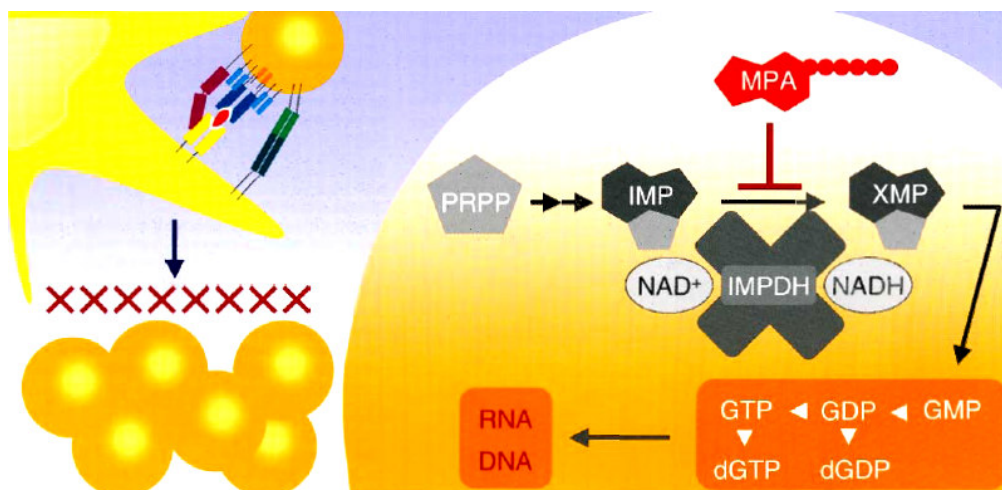
Selv om spesifisiteten til steroidhormoner oppnås gjennom interaksjoner med korresponderende reseptor, viser det seg at enzymet hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase (HSD11B) spiller en viktig rolle for vevsspesifisitet. Glukokortikoid aktivitet forutsetter en hydroksylgruppe i C11, og en ketogruppe i denne posisjonen vil gi et inaktivt steroid. Aktivisering og inaktivering skjer enzymatisk ved hjelp av hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase. Dette enzymet foreligger i to isoformer, HSD11B1 og HSD11B2. HSD11B1 aktiverer glukokortikoidet, mens HSD11B2 inaktiverer, se figur 1-5. Den vevsspesifikke ekspresjonen av de to isoenzymene spiller en sentral rolle i kortikosteroidenes fysiologi ved å regulere glukokortikoid og mineralkortikoid reseptoraktivering. HSD11B1 uttrykkes i lever, lunger, gonader, hypofyse, hjerne og fettvev, og har som funksjon å forsyne glukokortikoidreseptoren med kortisol. HSD11B2 uttrykkes i mineralkortikoide vev som nyrer, tykktarm, spyttkjertler og placenta, og har som funksjon å beskytte mineralkortikoidreseptoren mot kortisol. Liganden for denne reseptoren er aldosteron, men kortisol har like høy affinitet til reseptoren, og den bør derfor beskyttes mot høye sirkulerende konsentrasjoner av kortisol (7). En hydroksylgruppe i C11-posisjon er ikke avgjørende for den mineralkortikoide aktiviteten, men spiller allikevel en viktig rolle i reguleringen av mineralkortikoid reseptoraktivering.



Figur 1-5. Enzymatisk aktivering og inaktivering av glukokortikoider via hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 og 2 (HSD11B1 og HSD11B2).

1.2.6 Farmakodynamikk – mykofenolat (MPA)

Mykofenolatmofetil (MMF), CellCept[®], er 2-morfolinylesteren av mykofenolsyre, og administreres som et prodrug. Mykofenolat kan også administreres som natriumsaltet av mykofenolsyre, og er markedsført som Myfortic[®] (8). Mykofenolsyre (MPA) er den aktive metabolitten av både mykofenolatmofetil og natriumsaltet, og er en reversibel, ikke-kompetitiv hemmer av enzymet inosin-5'-monofosfat-dehydrogenase (IMPDH). IMPDH katalyserer oksidasjonen av inosin-5'-monofosfat (IMP) til xanthosin-5'-monofosfat (XMP). Dette er det hastighetsbestemmende trinnet i *de novo*-syntesen av guanin- og deoxyguanin-nukleotider (9). T- og B-lymfocytter er mer avhengige av denne synteseveien enn andre typer celler, da andre celler kan resirkulere puriner gjennom en alternativ omsetningsvei. Dette er grunnen til at mykofenolat har en mer potent cytostatisk effekt på lymfocytter enn andre celletyper (10). Proliferasjonen av T- og B-lymfocytter blir hemmet, og mykofenolat virker dermed immundempende. Virkningsmekanismen til mykofenolat er illustrert i figur 1-6.



Figur 1-6. Virkningsmekanisme for mykofenolat (MPA). (Inosinmonofosfat dehydrogenase (IMPDH); fosforibosyl pyrofosfat (PRPP); inosin 5'-monofosfat (IMP); xantosin 5'-monofosfat (XMP); nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD); (deoksy)guaninnuklosid mono-/di-/tri-fosfater ((d)GNP) (11).

1.2.7 Farmakokinetikk – mykofenolat (MPA)

Mykofenolatmofetil absorberes raskt etter oral administrasjon, og hydrolyseres til mykofenolsyre (MPA), som er den aktive substansen. MPA metaboliseres hovedsakelig av glukuronyl transferase til MPA-glukuronid (MPAG). Denne metabolitten er biologisk inaktiv, og skilles ut renalt. Biotilgjengeligheten etter en peroral dose med mykofenolatmofetil er på 94 %. Normalt er over 95 % av MPA bundet til albumin (4).

1.3 Bioanalyse

1.3.1 Prøveopparbeidelse

Biologiske matrikser, som blod, plasma og urin er komplekse blandinger og stoffene som skal analyseres foreligger ofte i konsentrasjoner i området pg/ml og µg/ml. Hensikten med prøveopparbeidelse er å skille analytten fra andre stoffer eller komponenter i matriksen som gir uønsket detektorrespons eller kan ødelegge analysesystemet. Konsentrasjonen av analytten i prøven kan også være så lav at det er nødvendig med oppkonsentrering, dette kan oppnås ved å velge en egnet prøveopparbeidelsesmetode.

Fullblod består av erytrocytter, leukocyter, trombocyter og en væskefase. Cellene utgjør 41-46% av blodvolumet. Resten består av vann, ioner, små uladete forbindelser og proteiner (albumin, fibrinogen, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin og γ -globulin). Serum lages ved at fullblod koagulerer. Etter sentrifugering vil blodcellene legge seg på bunnen av glasset, og væskefasen som ligger på toppen kalles serum. Plasma lages ved at blodprøven som tappes tilsettes en antikoagulant, for eksempel EDTA eller heparin. Denne sentrifugeres, og den svakt gule væsken som ligger på toppen er plasmaet. Dette kan avpipetteres for videre analyse (12).

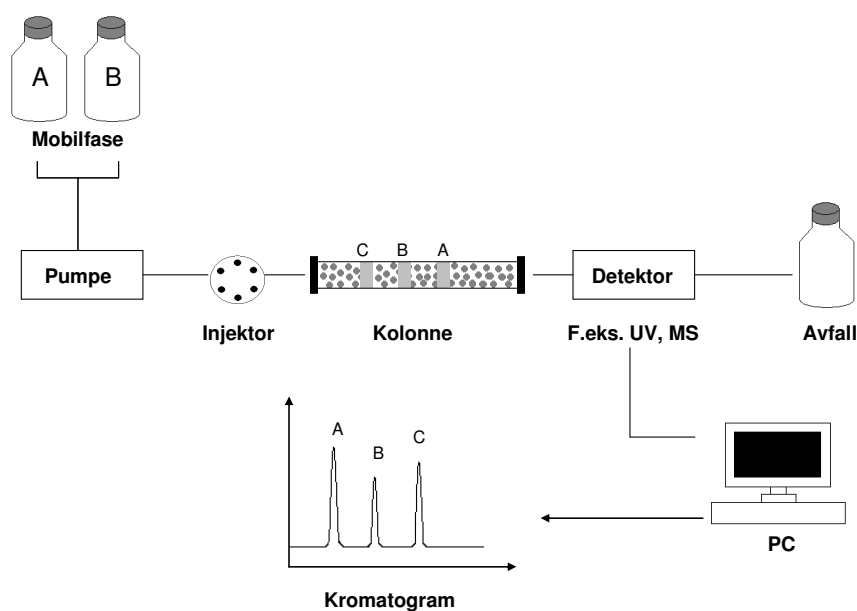
Proteinene i plasma kan ikke injiseres i en LC-MS, da de enten kan felle ut i injektoren, kolonnen eller i massespektrometeret. Disse må derfor fjernes før prøven kan analyseres. Plasmaproteiner kan fjernes ved proteinfelling. Analytter som er proteinbundet vil også dissosiere fra proteinene, slik at totalkonsentrasjonen måles. Vanlige fellingsreagenser er metanol og acetonitril. Prøven tilsettes da fellingsreagens, proteinene denatureres og felles ut. Prøven sentrifugeres og supernatanten avpipetteres og analyseres.

Proteinfelling er en relativt grov prøveopparbeidelse, der kun proteinene fjernes. I prøven vil det fortsatt være både polare og upolare forurensninger, som kan interferere i analysen. Legemiddelet eller ønsket analytt kan isoleres fra disse forurensningene ved ekstraksjon. I en ekstraksjon benyttes en annen fase som ikke er blandbar med prøven. Væske-væske-ekstraksjon benytter seg av to ikke-blandbare væsker. Ved vandige biologiske prøver som urin, blod og plasma vil den andre fasen være et organisk løsemiddel. Dersom analytten har høyere affinitet til den organiske fasen, vil den bli ekstrahert over, mens mer hydrofile stoffer vil være igjen i vannfasen. Den organiske fasen kan da tas av og enten ekstraheres flere ganger eller dampes inn og løses på nytt i egnet løsemiddel for deretter å bli analysert. Væske-væske-ekstraksjon er en egnet metode for å oppkonsentrere prøven og oppnå et rent ekstrakt. En annen måte å utføre ekstraksjon på er fast-fase-ekstraksjon, men denne metoden skal ikke omtales nærmere.

1.3.2 Kromatografi

Kromatografi er en separasjonsmetode som baserer seg på at to komponenter separeres fra hverandre ved at de blir fordelt mellom to ublandbare faser: en mobil fase som beveger seg gjennom en stasjonær fase. Teknikken blir navngitt etter hvilken mobilfase som er i bruk,

gasskromatografi (GC) eller væskekromatografi (LC). Den stasjonære fasen består av faste partikler som er pakket sammen i en kolonne. Mobilfasen pumpes gjennom kolonnen med en bestemt hastighet. Separasjonen er et resultat av gjentatte interaksjoner mellom analytten og den stasjonære fasen. Ulike analytter har forskjellige affinitet til mobil og stasjonær fase. De transporteres da gjennom kolonnen med ulik hastighet og separeres. Grad av oppbremsing på kolonnen kalles retensjon, og dersom retensjonen er forskjellig for de ulike stoffene i prøven, vil stoffene bli separert. Stoffene eluerer til forskjellige tider, og har dermed forskjellig retensjonstid. Når stoffene har eluert, blir de detektert i en detektor, og på bakgrunn av dette konstrueres et kromatogram, som er respons plottet mot tid. Et typisk kromatografioppsett er vist i figur 1-7.



Figur 1-7. Skjematisk fremstilling av et kromatografioppsett

1.3.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

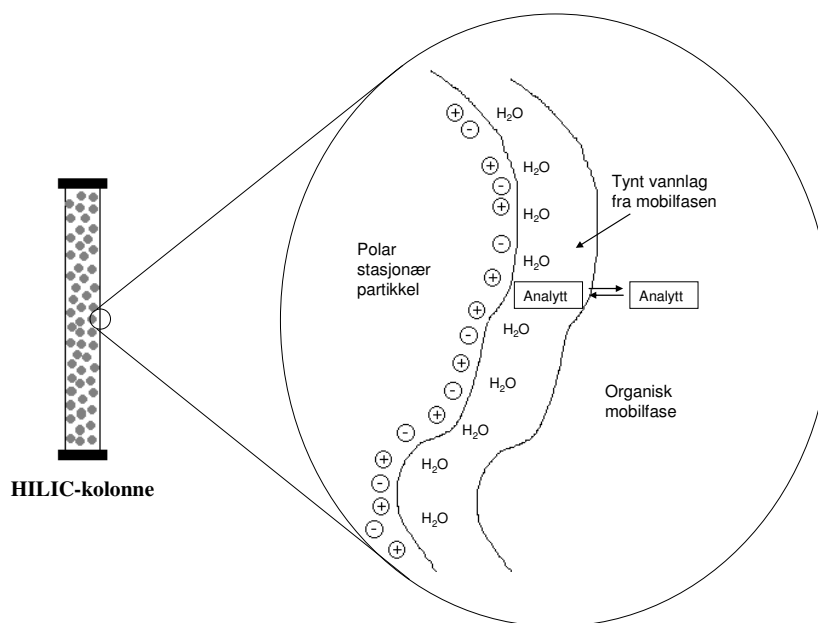
Væskekromatografi (LC, liquid chromatography) er en av de mest brukte metoder til å bestemme legemidler i farmasøytiske preparater eller biologisk materiale. Innen væskekromatografi skilles det mellom omvent-fase-kromatografi, normalfasekromatografi og eksklusjonskromatografi. Av disse er omvendt-fase-kromatografi det viktigste separasjonsprinsippet. I omvendt-fase-kromatografi er mobilfasen mer polar enn stasjonærfasen. Partiklene i stasjonærfasen har da upolare grupper på overflaten, og stoffene

retarderes av hydrofobe interaksjoner. Mobilfasen som brukes her består av vandige løsninger. I normalfasekromatografi er stasjonærfasen mer polar enn mobilfasen, og består av partikler med polare grupper på overflaten. Her består mobilfasen av organiske løsemidler og stoffene retarderes av polare interaksjoner. Eksklusjonskromatografi separerer stoffene etter molekylstørrelse (12).

1.3.4 Hydrofil interaksjonskromatografi (HILIC)

Et annet separasjonsprinsipp innen væskechromatografi kalles *hydrofil interaksjonskromatografi* (HILIC, Hydrophilic Interaction Chromatography). HILIC er en variant av normalfasekromatografi hvor den stasjonære fasen er polar og mobilfasen består av en høy konsentrasjon organisk løsningsmiddel og en lav konsentrasjon vandig løsningsmiddel. I HILIC er den organiske andelen det svake løsningsmiddelet, mens den vandige delen er det sterke løsningsmiddelet. Analyttene vil dermed eluere ut etter økende polaritet. HILIC blir ofte omtalt som ”vandig normalfasekromatografi” eller ”omvendt-omvendt-fase-kromatografi”, siden elueringsrekkefølgen er den samme som i normalfasekromatografi, mens løsningsmidlene som brukes tilsvarer de som brukes i omvendt-fase-kromatografi.

Den stasjonære fasen i HILIC består av et polart materiale med aktive grupper som for eksempel silika, amino, cyano eller diol. Den vandige delen av mobilfasen vil danne et vandig sjikt over den stasjonære fasen. Polare analytter vil da fordele seg mellom mobilfasen og dette vannlaget, noe som gir grunnlaget for retensjon, se figur 1-8. Bruken av HILIC har lenge vært begrenset, men de siste årene har det skjedd en økning. En av årsakene til dette kan være utstrakt bruk av HPLC koblet til massespektrometri (MS). Kombinasjonen av en liten andel vandig løsemiddel i acetonitril er gunstig i elektroprayonisering (ESI) i MS, da acetonitril er flyktig, og fordampningen av mobilfasen skjer raskere (13).



Figur 1-8: Partikkeloverflate i en HILIC-kolonne

1.3.5 Massespektrometri (MS) - generelt

Et massespektrometer er et avansert analytisk instrument, som består av en ionekilde, masseanalysator, detektor og en datamaskin med tilhørende programvare. Massespektrometri anvendes ofte i kombinasjon med væskerkromatografi (LC-MS) eller gasskromatografi (GC-MS). Da vil analyttene først bli separert i et kromatografisk system, og massespektrometeret fungerer som en avansert detektor.

I massespektrometeret bombarderes organiske forbindelser med elektroner i vakuum. Dette fører til at molekylene ioniseres til positive eller negative ioner, som kalles molekylioner. I noen tilfeller er disse molekylionene ustabile, og vil spaltes til mindre fragmenter. Ionisering og påfølgende fragmentering foregår i en ionekilde i massespektrometeret. Massen til molekylioner og fragmenter som fortsatt er ladet bestemmes i en masseanalysator. Her separeres ionene etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z), m/z . Massespektrometri er en teknikk som baserer seg på måling av m/z . Resultatet er et massespektrum der relativ forekomst av ionet plottes mot m/z (14).

1.3.6 Elektrosprayionisering (ESI)

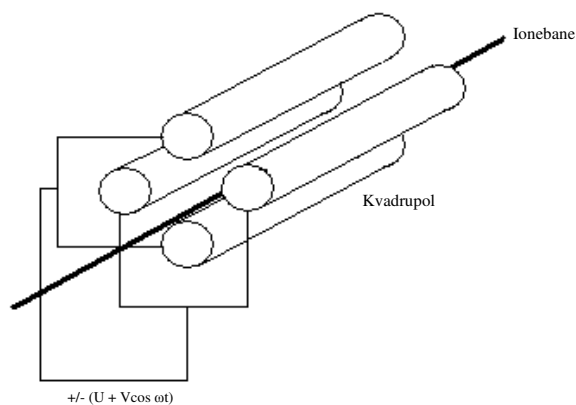
Elektrosprayionisering er en svært mye brukt ioniseringsteknikk for LC-MS. Denne ioniseringsteknikken foregår under atmosfæretrykk, og ikke i vakuum. ESI er en myk ioniseringsteknikk, noe som innebærer at det stort sett dannes molekyllioner og ikke fragmenter av disse. ESI fungerer ved at mobilfasen med analyttene drives gjennom et tynt metallkapillær der det er lagt på høy spenning, vanligvis 3-4 kV. Den høye spenningen finfordeler væskestrømmen og danner ladede dråper som fordampes av nitrogengass i ionekilden. Etter hvert som dråpestørrelsen blir redusert vil de frastøtende kreftene være større enn overflatespenningen, og man vil få en såkalt "Coulombic explosion". Da vil hver dråpe danne mange mindre dråper, og etter hvert vil løsningsmidlene være fordampet av nitrogengassen og ionene blir fokusert inn i masseanalysatoren ved hjelp av ulike linser (15).

En annen ioniseringsteknikk som er i bruk ved LC-MS er atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (APCI). Som i ESI føres også prøven inn i massespektrometeret i en væskestrøm, og selve ioniseringen skjer ved atmosfæretrykk. Væsken med prøvekomponentene passerer gjennom et oppvarmet metallkapillær, og ved utløpet av dette vil væsken fordampe og transporteres bort av en tørkegass, oftest nitrogen. Forskjellen fra ESI ligger i at en nål med høyt elektrisk potensial ioniserer nitrogen og vann. Dette danner radikaler som vil reagere med analyttene ($[MH]$). Protonerte ($[MH_2]^+$) eller deprotonerte ($[M]^-$) bringes deretter inn i massespektrometeret, og massene bestemmes. APCI er også en myk ioniseringsteknikk, og er spesielt egnet til analytter som ikke inneholder ioniserbare grupper (12).

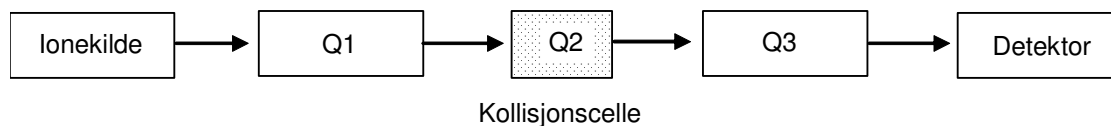
1.3.7 Tandem-massespektrometri (MS/MS)

MS/MS består av to trinn med massespektrometri etter hverandre. Det første trinnet isolerer et ion av interesse. Dette ionet fragmenteres i et kollisjonskammer. Neste trinn isolerer deretter de fragmentene som er av interesse, og disse detekteres i en detektor. Et av de vanligste MS/MS-instrumentene består av en trippelkvadrupol. Ionefelle eller en Time-of-flight-analysator er eksempler på andre typer. En trippelkvadrupol består av tre kvadrupoler, Q1, Q2 og Q3, der Q2 er en kollisjonscelle og egentlig en heksapol. Hver kvadrupol består av fire parallelle staver som er pålagt et elektrisk felt. Feltstyrken vil avgjøre hvilke masser som kan passere gjennom kvadrupolen. Det pålegges vekselstrøm, noe som gjør at ionene oscillerer. Kun de ionene som oscillerer stabilt gjennom kvadrupolen treffer detektoren. Dette er illustrert i figur 1-9. Kollisjonscellen er også en kvadrupol, men i stedet for vakuum er det her

en kollisjonsgass og denne består som regel av argon. I den tredje kvadrupolen (Q3) selekteres fragmenter av interesse ut, og bringes videre til detektoren (14).



Figur 1-9. Skjematisk tegning av en kvadrupolanalytator



Figur 1-10. Skjematisk tegning av en trippelkvadrupol

1.3.8 Monitoreringsteknikker

Innen MS/MS skilles det mellom ulike monitoreringsteknikker:

- Product Ion Scanning
- Selected Reaction Monitoring (SRM)
- Multiple Reaction Monitoring (MRM)
- Precursor Ion Scan
- Neutral Loss

Mest brukt av disse er de tre øverste. Ved Product Ion Scanning velges det ut et bestemt ion i Q1, og Q3 innstilles på fullt scan. Da kan man se alle fragmentene som molekylionet fragmenterer til. Ved SRM måles det på et spesielt fragment fra et spesielt molekylion, dvs. én spesiell overgang. Ved MRM måles det på bestemte overganger fra ett bestemt molekylion. Begrepene SRM og MRM brukes ofte om hverandre i litteraturen. Ved Neutral

Loss stilles Q1 og Q2 på en bestemt m/z -differanse, for å monitorere en avspalting av et spesielt fragment fra molekylet (14).

1.3.9 Matrikseffekter

Matrikseffekter, da spesielt ionesuppresjon, oppstår når biologisk matriks inneholder stoffer som endrer ioniseringseffektiviteten i elektrospøyen, og er spesielt et problem hvis de eluerer samtidig som analyttene (16). Disse koeluerende stoffene er ofte ikke-flyktige og befinner seg i høye konsentrasjoner i spøyen, for eksempel fosfolipider, sulfater og fosfater. Mekanismen bak ionesuppresjon er ikke helt klarlagt, men det er trolig konkurranse mellom de ikke-flyktige matrikskomponentene og analyttionene om overflaten på dråpen (17). Dette resulterer i at færre av analyttionene vil komme over i gassfasen og nå detektoren, noe som fører til dårligere signalintensitet.

2. Hensikt

Målet med denne hovedfagsoppgaven er å utvikle en LC-MS/MS-metode til å kvantifisere glukokortikoider og mykofenolat i humant plasma. De aktuelle glukokortikoidene er kortisol, kortison, prednisolon, prednison, metylprednisolon og metylprednison.

Bakgrunnen for valget av disse steroidene er at både prednisolon og metylprednisolon inngår i de fleste immunsuppressive behandlingsregimer, mens kortisol er et endogent steroid som kan være aktuelt å måle i flere sammenhenger. I første rekke skal denne metoden brukes til å se på forholdet mellom de aktive steroidene kortisol, prednisolon og metylprednisolon og deres inaktive 11-ketometabolitter kortison, prednison og metylprednison. Dette skal i senere prosjekter brukes til å se på aktiviteten til de to enzymene HSD11B1 og HSD11B2, nevnt i tidligere avsnitt.

Rutineanalyser av mykofenolat blir på seksjonen i dag kjørt ved hjelp av HPLC-UV. Da de fleste transplanterte pasienter står på et doseringsregime bestående av både glukokortikoider og mykofenolat, kan det være hensiktsmessig å samle dette i én metode. Dette er årsaken til at mykofenolat inkluderes i analysemetoden.

3. Materialer og metoder

3.1 Analytter, kjemikalier og utstyr

Tabell 3-1 viser hvilke analytter, kjemikalier og utstyr som er brukt i forbindelse med denne hovedfagsoppgaven, samt kvalitet og leverandør.

Tabell 3-1. Oversikt over analytter, kjemikalier og utstyr

Analytter/kjemikalier	Kvalitet	Produsent
Hydrocortisone VETRANAL [®]	99,9 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Cortisone	> 95 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Prednisolone VETRANAL [®]	98,9 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Prednisone	> 98 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
6 α -methylprednisolone VETRANAL [®]	98,7 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
6 α -methylprednisone	~ 100 %	Steraloids, Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Flumethasone	97 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Prednisolone- <i>d6</i>	> 97 % atom D	C/D/N Isotopes, Quebec, Canada
Mycophenolic acid	98 %	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Methanol	HPLC	Rathburn Chemicals Ltd, Walkern, Scotland
Acetonitrile	HPLC	Rathburn Chemicals Ltd, Walkern, Scotland
Formic acid (maursyre)	LC-MS	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Ammonium acetate	LC-MS	Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA
Dichloromethane	HPLC	Rathburn Chemicals Ltd, Walkern, Scotland

Utstyr	Type	Produsent
HPLC	Waters AllianceHT 2795	Waters, Manchester, UK
MS/MS	Waters Micromass Quattro <i>micro</i> TM API	Waters, Manchester, UK
Software	MassLynx TM	Waters, Manchester, UK
Nitrogengenerator	LCMS 30-0	Domnick Hunter Ltd., Gateshead, England
Argongass	Argon 99,999 %	AGA AS, Oslo, Norge
Guardkolonne	Phenomenex [®] Guard Column System C8	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Analysekolonner	- Waters Atlantis [®] HILIC Silica 3 μ m, 3,1 x 50 mm	Waters, Manchester, UK
	- Waters Atlantis [®] HILIC Silica 5 μ m, 4,6 x 150 mm	Waters, Manchester, UK
	- MercuryMS Phenomenex [®] Luna C18(2) 3 μ m, 20 x 2,0 mm	Phenomenex, Torrance, CA, USA
	- MercuryMS Phenomenex [®] Synergy 2,5 μ m Hydro-RP, 20 x 2,0 mm	Phenomenex, Torrance, CA, USA
Vannsystem	MilliQ Biocel System	Millipore, Billerica, MA, USA
Fordampningsapparat	Zymark Turbo Vap [®] RV Evaporator	Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA

3.2 Tillaging av løsninger og mobilfase

3.2.1 Mobilfase

Mobilfasen består av to ulike løsninger, som skal blandes i en gradient:

- A: 95 % acetonitril + 0,2 % (v/v) maursyre + 10 mM ammoniumacetat
- B: Vann + 0,2 % (v/v) maursyre + 10 mM ammoniumacetat

1 L mobilfase A lages ved å løse 0,7708 g ammoniumacetat i 50 ml vann. Deretter tilsettes 2 ml maursyre og fylles opp til 1000 ml med acetonitril.

1 L mobilfase B lages ved å løse 0,7708 g ammoniumacetat i litt vann. 2 ml maursyre tilsettes og det fylles på med vann, til sammen 1000 ml.

3.2.2 Stamlløsninger og fellingsreagens

Stamlløsningene ble lagd ved å løse analytten i acetonitril i en målekolbe. Metylprednison har ved så høy konsentrasjon dårlig løselighet i acetonitril, og løses derfor i en blanding av 4 ml acetonitril og 1 ml metanol. Ved tillaging av stamlløsningene ble det tatt hensyn til renheten av råvarene. De aktuelle konsentrasjonene og volumene som brukes er oppsummert i tabell 3-2.

Tabell 3-2. Oversikt over stamlløsninger

Analytt	Volum	Konsentrasjon	Innveies	Renhet tørrstoff
Prednisolon	10 ml	1 g/L (2,77 mM)	10,1 mg	99 %
Prednison	10 ml	1 g/L (2,79 mM)	10,2 mg	98 %
Kortisol	10 ml	1 g/L (2,76 mM)	10,0 mg	99,9 %
Kortison	10 ml	1 g/L (2,77 mM)	10,5 mg	95 %
Metylprednisolon	10 ml	1 g/L (2,66 mM)	10,1 mg	98,7 %
Metylprednison	5 ml	1 g/L (2,68 mM)	5,0 mg	~100 %
MPA	10 ml	4 g/L (12,48 mM)	40,8 mg	98 %
Flumetason	10 ml	1 g/L (2,43 mM)	10,3 mg	97 %
Prednisolon- <i>d6</i>	5 ml	1 g/L (2,75 mM)	5,2 mg	97 %

Som *fellingsreagens* til proteinfelling brukes acetonitril som inneholder de to internstandardene flumetason og prednisolon-*d6*. Konsentrasjonen av internstandardene i fellingsreagenset ble satt til 150 µg/L. Fellingsreagenset lages ved å tilsette 30 µl stamlløsning (1 g/L) av flumetason og prednisolon-*d6* i en målekolbe og fylle opp til 200 ml med acetonitril (HPLC-kvalitet).

3.2.3 Kalibratorer og kontroller

Plasmakalibratorer og kontroller lages av legemiddelfritt plasma som er tilsatt analyttene i kjente mengder. Konsentrasjon av analyttene i kalibratorer og kontroller er oppsummert i tabell 3-3.

Tabell 3-3. Konsentrasjoner i kalibratorer og kontroller.

	Konsentrasjon (µg/L) i kalibrator/kontroll						
	Prednisolon	Prednison	Kortisol	Kortison	Metylprednisolon	Metylprednison	MPA (mg/L)
Kalibrator 1	10	5	5	5	20	10	0,48
Kalibrator 2	20	10	10	10	100	20	0,96
Kalibrator 3	40	20	20	20	400	40	1,6
Kalibrator 4	100	30	40	30	1000	100	3,2
Kalibrator 5	200	50	100	50	2000	200	16
Kalibrator 6	400	100	200	100	4000	400	32
Kontroll 1	20	10	10	10	100	20	0,96
Kontroll 2	100	30	40	30	1000	100	3,2
Kontroll 3	400	100	200	100	4000	400	32

Det lages seks forskjellige arbeidsløsninger (A1-A6) som inneholder seks forskjellige konsentrasjonsnivåer av analyttene i metanol/vann (9:1). 0,5 ml av arbeidsløsningene tilsettes dråpevis til 10 ml plasma, med samtidig risting av glasset. Kalibratorene og kontrollene lages ved hjelp av arbeidsløsninger for å unngå utfelling av analyttene i det de blir tilsatt til plasma, i tillegg til at det er praktisk å tilsette et bestemt volum arbeidsløsning til alle nivåene av kalibratorene og kontrollene. Risting ved tilsetning av arbeidsløsning er viktig for å unngå utfelling av plasmaproteiner. Detaljer og utregninger i forbindelse med tillaging av arbeidsløsninger, kalibratorer og kontroller er gjengitt i Vedlegg 1.

3.3 Prøvemateriale

Prøvematerialet som ble benyttet under metodeutviklingen ble hentet fra friske frivillige i en pågående studie i forskningsgruppen og fra rutineanalyser ved seksjonen. Legemiddelfritt plasma (Octaplas) ble brukt til fremstilling av kalibratorer og kontroller. Til validering av metoden ble det benyttet fulle doseintervall med glukokortikoider og MPA. Disse prøvene ble innhentet fra levertransplanterte pasienter i en nylig påbegynt studie, der skriftlig samtykke er innhentet fra pasientene. I tillegg til disse doseintervallene, ble det under validering også benyttet en pool av plasmaprøver, innhentet fra rutineanalyser ved avdelingen.

3.4 Utvikling av LC-MS/MS-metode for glukokortikoider og mykofenolat

3.4.1 Intern standard

Hensikten med en intern standard er å korrigere for tilfeldige endringer som skjer under prøveopparbeidelsen, kromatografien og ved ioniseringen. Valg av intern standard gjøres på bakgrunn av analyttens kjemiske egenskaper. For at en intern standard skal være egnet, må den ha samme kjemiske egenskaper som analytten. Dette er viktig for at den interne standarden skal oppføre seg likt som analytten, og dermed kunne reflektere hvor mye av analytten som har gått tapt underveis. I massespektrometri er det gunstig med en intern standard som har samme struktur og kjemiske egenskaper som analytten, men ulik masse. Disse vil da oppføre seg likt under prøveopparbeidelsen, kromatografien og ioniseringen, men de kan skilles på massen (18). Eksempel på dette er analytter som er isotopmerkede, ofte med deuterium. Et eller flere hydrogenatomer er da erstattet med deuterium, som er én atommasseenhet tyngre enn hydrogen. På bakgrunn av dette ble prednisolon-*d6* valgt som intern standard. Dette er prednisolon som har seks deuteriumatomer fordelt på posisjon 2,4,6 og 21. I tillegg til isotopmerket prednisolon ble også flumetason valgt som intern standard. Flumetason er en analog intern standard, og er mer fysikalsk-kjemisk forskjellig fra analyttene enn det en isotopmerket intern standard er. En analog intern standard kan allikevel være godt egnet, så lenge det velges en som deler mange av de kjemiske egenskapene som analyttene har. Valget av flumetason skjedde på grunnlag av en tidligere publisert metode for tre av de aktuelle analyttene (19). Flumetason er ikke registrert som et legemiddel i Norge, og det er lite trolig at noen av prøvene vil inneholde flumetason og dermed interferere med fortolkningen av resultatene.

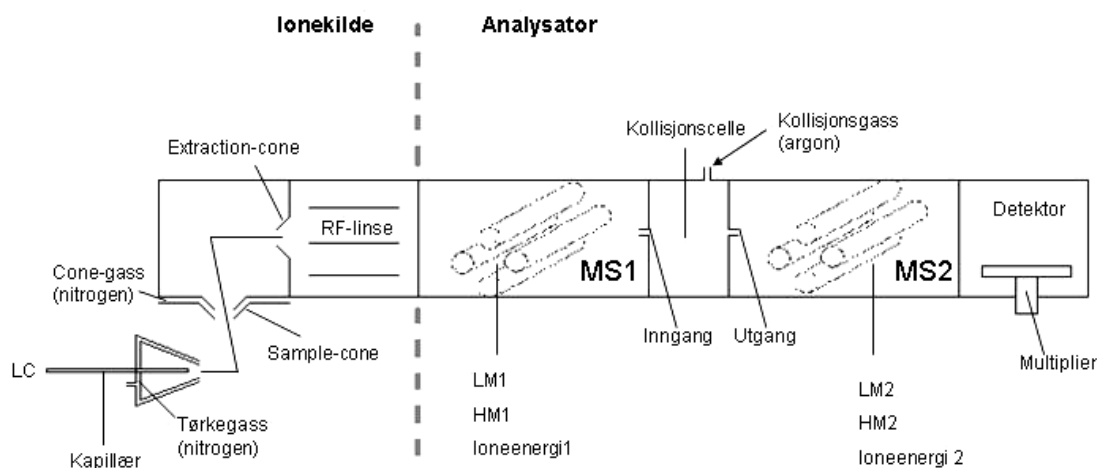
Det er vanskelig å velge ut en intern standard som skal dekke alle analyttene. Det ideelle ville vært én intern standard per analytt, men dette går betraktelig ut over sensitiviteten, da det dobler antallet m/z -overganger som skal monitoreres. Valget av flumetason og prednisolon-*d6* er derfor et kompromiss mellom god nok sensitivitet og nødvendig antall interne standarder. En annen fordel med disse interne standardene er at de har en masse som skiller seg betraktelig fra analyttene, noe som reduserer sannsynligheten for interferenser og cross-talk.

Hvilken intern standard som skal brukes til hver av analyttene under reprosessering av data, ble funnet ved prøving og feiling i programvaren QuanLynxTM. Under innhøstingen av data blir det dannet kromatogrammer for både flumetason og prednisolon-*d6*. For hver analytt ble

det forsøkt reprosesert med både flumetason og prednisolon-*d6*. Den interne standarden som gav best kalibreringskurve ble valgt.

3.4.2 Tuning

Ved tuning er hensikten å finne de innstillingene på massespektrometeret som gir best signalintensitet av analyttene. Dette kan enten gjøres manuelt eller automatisk i programvaren MassLynx™, begge deler ble gjort. Noen av parametrene er stoffspesifikke, og må dermed tunes for hver av analyttene. Dette gjelder kollisjonsenergi og cone-spenning. De øvrige parametrene er ikke stoffspesifikke, og en felles innstilling av disse kan derfor brukes. Til tuningen brukes en løsning med konsentrasjon 210 µg/L av alle analyttene og interne standarder i acetonitril. Denne løsningen injiseres i en kontinuerlig strøm fra en sprøyte inn i massespektrometeret sammen med mobilfase, og ut fra signalintensiteten optimaliseres parametrene. Figur 3-1 illustrerer hvordan et massespektrometer av trippelkvadrupoltypen er bygd opp, og hvilke tuningparametere som kan stilles inn.



Figur 3-1. Sjematisk fremstilling av et massespektrometer av trippelkvadrupoltypen. (LM: Oppløsning ved lave m/z ; HM: Oppløsning ved høye m/z).

Monitoreringsteknikken som benyttes er "Multiple Reaction Monitoring" (MRM). Det måles da på én spesiell overgang (fragmentering) for hver av analyttene. (Enkelte omtaler dette som "Selected Reaction Monitoring" (SRM)). For alle stoffene, med unntak av MPA, ble det målt på protonert molekyllion, $[M+H]^+$. MPA monitoreres ved hjelp av ammoniumet, $[M+NH_4]^+$. Vanligvis er det mest gunstig å måle på protonerte molekyllioner, og ikke addukter. Men så

lenge det måles på et addukt der fraksjonen av produsert addukt er konstant, kan adduktet brukes til monitorering. Dette er tilfellet her, da konsentrasjonen av ammoniumioner i mobilfasen er fast. En gunstig effekt ved å tilsette ammoniumacetat til mobilfasen, er at produksjonen av natriumaddukter reduseres til fordel for ammoniumaddukt eller protonert molekylion. På denne måten kan man lede adduktdannelsen mot bare et addukt (14).

3.4.3 Ioniseringsteknikk

Massespektrometeret gir rom for å benytte to typer ioniseringsteknikker, elektropray-ionisering (ESI) og atmosfæretrykk-kjemisk-ionisering (APCI). Begge disse teknikkene kan brukes i enten positiv eller negativ modus. Valg av ioniseringsteknikk avhenger av analyttenes kjemiske egenskaper. ESI brukes fortrinnsvis til analytter med ioniserbare grupper, mens APCI er godt egnet analytter som ikke er ioniserbare (12). Best egnet ioniseringsteknikk avgjøres ved å tune massespektrometeret ved de ulike ioniseringsteknikkene, og sammenligne signalintensiteten til analyttene.

3.4.4 Kolonner

Det er publisert flere metoder for analyse av glukokortikoider på LC-MS/MS (19,20). I disse metodene benyttes det omvendt-fase-kromatografi med C18-kolonner. På bakgrunn av dette og at glukokortikoider utgjør en relativt hydrofob stoffgruppe, ble kolonnen MercuryMS Phenomenex[®] Luna C18(2) 3 µm, 20 x 2,0 mm valgt. Dette er en kort kolonne, en såkalt cartridge, som gir kort analysetid. Phenomenex[®] Guard Column System C8 ble brukt som forkolonne. Forkolonnen har som formål å konsentrere analyttene før de når analysekolonnen, i tillegg til å filtrere bort partikler eller retardere mer hydrofile forurensninger og dermed få separert disse fra analyttene. Forsøksvis ble også MercuryMS Phenomenex[®] Synergy 2,5 µm Hydro-RP, 20 x 2,0 mm prøvd ut som analysekolonne. Denne kolonnen har et mer hydrofobt pakkemateriale enn Phenomenex[®] Luna C18(2).

I tillegg til å bruke tradisjonell omvendt-fase-kromatografi med C18-kolonne, ble også HILIC-prinsippet testet ut. Kolonnevalget falt da på Waters Atlantis[®] HILIC Silica 5 µm, 4,6 x 150 mm, og senere Waters Atlantis[®] HILIC Silica 3 µm, 3,1 x 50 mm.

3.4.5 Mobilfase

Ved valg av mobilfase til elektroprayionisering er det viktig at det brukes løsemidler og buffere som er flyktige, lite viskøse og med lav overflatespenning, dette for å få analyttene raskest mulig over i gassform. Mobilfasesammensetningen ble valgt ut fra en tidligere publisert metode for prednisolon (20). Mobilfasen som brukes i omvendt-fase-kromatografien består av to ulike løsninger, som skal blandes i en gradient:

- A: Vann + 0,1 % maursyre (v/v) + 2 mM ammoniumacetat
- B: Metanol + 0,1 % maursyre (v/v) + 2 mM ammoniumacetat

Til HILIC-kolonnen ble mobilfasesammensetningen endret til den produsenten anbefalte i kolonnens pakningsvedlegg:

- A: Vann + 0,2 % maursyre (v/v) + 10 mM ammoniumacetat
- B: 95 % acetonitril + 0,2 % maursyre (v/v) + 10 mM ammoniumacetat

Årsaken til at det ikke brukes 100 % acetonitril er at HILIC-kolonnen er avhengig av en liten andel vann i mobilfasen for å opprettholde vannlaget rundt partiklene, da det er dette som gir grunnlaget for retensjon.

Løsninger med analytter i metanol ble injisert som vanlig, og flowhastighet fra 100-600 µl/min ble forsøkt. Toppene i kromatogrammene ble vurdert ut fra signalintensitet.

Den endelige mobilfasegradienten til begge kolonnene ble funnet ved systematisk prøving og feiling av ulike gradienter.

3.4.6 Carry-over

Med carry-over menes at rester fra forrige prøve som ble analysert blir overført til påfølgende prøver og interferer med tolkningen av resultatene. Dette kan unngås ved å ha egnede vaskerutiner mellom prøvene. For å undersøke om det foreligger carry-over mellom prøvene injiseres ren løsning av analyttene, med påfølgende blank injeksjon av løsemiddelet som analyttene skal løses i. Konsentrasjonen av analyttene bør være relativt høy i renløsningen. Ved fravær av carry-over ved høye konsentrasjoner, er det sannsynlig at det heller ikke vil forekomme ved lavere konsentrasjoner, som det normalt skal måles på. Konsentrasjonen som ble brukt var dobbel så høy som kalibrator nivå 6. Forsøket ble kombinert med

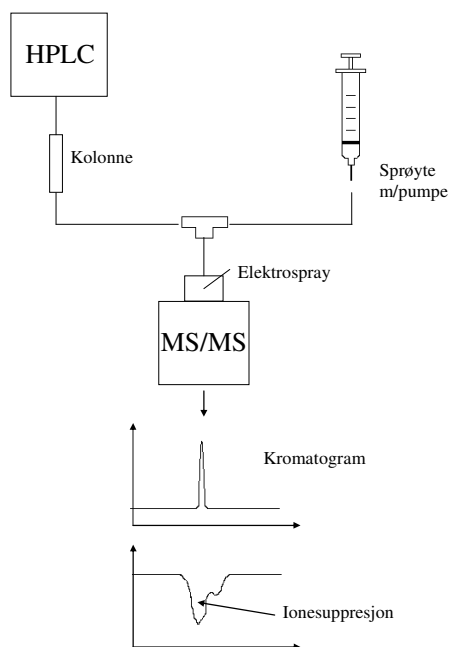
interferenstesting i avsnitt 3.4.7, da man kan få ut informasjon om både carry-over og interferenser i samme forsøk. Ved fravær av carry-over skal kromatogrammene for de blanke prøvene mellom hver injeksjon være blanke.

3.4.7 Interferenser

For å undersøke i hvilken grad analyttene og de interne standardene interfererer med hverandre ble det satt opp forsøk der analyttene ble injisert hver for seg i ren løsning, mens det ble målt på overgangene til alle analyttene. Konsentrasjonen på løsningene som ble brukt var dobbelt så høy som den øverste kalibratoren. Dette forsøket ble gjort under de kromatografiske betingelsene som ble funnet optimale. Dersom det ikke er noen interferenser, skal det kun komme signaler ved den injiserte analyttens overgang. Forsøket ble kombinert med carry-over-forsøket i avsnitt 3.4.6.

3.4.8 Matrikseffekter

En av metodene som kan brukes til å undersøke matrikseffekter er et post-kolonne infusjonssystem, vist i figur 3-2. En sprøyte tilkoblet en pumpe injiserer en konstant strøm av en løsning med de aktuelle analyttene inn i massespektrometeret. Løsningen bestod av 210 µg/L med alle analyttene løst i acetonitril. Triplikater av legemiddelfrie, opparbeidede plasmaprøver fra fem forskjellige individer, A-E, injiseres i HPLC-apparatet. Kromatogrammet som tas opp viser en reduksjon i signalstyrke dersom noen av plasmakomponentene gir ionesuppresjon. Dersom retensjonstiden for analyttene sammenfaller med tidspunktet der det oppstår ionesuppresjon, vil dette ha betydning for signalstyrken til analyttene. Dette bør om mulig unngås.



Figur 3-2. Skjematisk tegning av et post-kolonne infusjonssystem

3.5 Prøveopparbeidelse

For å finne den optimale prøveopparbeidelsen ble det satt opp et forsøk som sammenligner fire forskjellige prøveopparbeidelsesprosedyrer:

- Enkel proteinfelling
- Enkel væske-væske-ekstraksjon med diklormetan
- Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med vann
- Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med vann, HCl og NaOH.

Hver av prosedyrene ble utført på plasmaprøver i duplikater fra fem pasienter og en blank plasmaprøve. Prøvene ble analysert på LC-MS/MS for å sammenligne signalintensitet.

Prosedyrene er basert på en tidligere publisert metode, men med enkelte modifikasjoner (21). Diklormetan har kokepunkt på 39,75 °C (22). Vannbadet som brukes ved inndamping stilles derfor inn på 40 °C.

Enkel proteinfelling

500 µl plasma felles med 500 µl fellingsreagens med interne standarder i et spisst sentrifugerør, med påfølgende vortexmiksing i 10 sekunder. Prøven sentrifugeres ved 10900 rpm (Abbott bordsentrifuge) i 4 minutter. 800 µl av supernatanten avpipetteres og overføres

til et borosilikatglass. Supernatanten dampes til tørrhet under nitrogengass, ved 40 °C. Inndampingsresten løses i 100 µl acetonitril. Denne sentrifugeres deretter ved 3500 g i 5 minutter, og supernatanten overføres til autosamplerglass. Prøven analyseres deretter i LC-MS/MS.

Enkel væske-væske-ekstraksjon med diklormetan

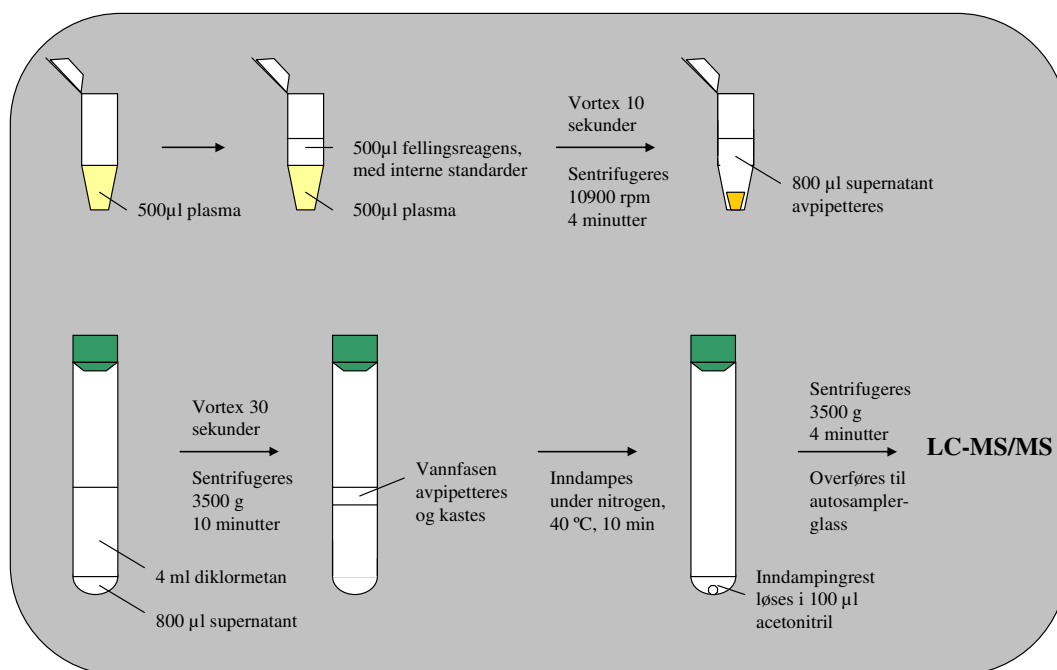
Proteinfelling utføres som beskrevet over. Til supernatanten tilsettes 4 ml diklormetan og vortexmikses i 30 sekunder. Prøven sentrifugeres deretter ved 3500 g i 5 minutter. Vannfasen, som er den øverste, tas av og kastes. Den organiske fasen dampes til tørrhet og løses som beskrevet i forrige avsnitt. Prosedyren er gjengitt i figur 3-3.

Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med vann

Proteinfelling utføres som beskrevet over. Til supernatanten tilsettes 4 ml diklormetan og vortexmikses i 30 sekunder. Prøven sentrifugeres deretter ved 3500 g i 5 minutter. Vannfasen, som er den øverste, tas av og kastes. Den organiske fasen vaskes med 1 ml H₂O og vortexmikses i 30 sekunder og sentrifugeres ved 3500 g i 5 minutter. Vannfasen tas av og kastes. Den organiske fasen dampes inn og løses som beskrevet over.

Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med NaOH, HCl og vann.

Først utføres proteinfelling og væske-væske-ekstraksjon med diklormetan som beskrevet over. Den organiske fasen vaskes med 1 ml 0,1 M NaOH, vortexmikses i 30 sekunder og sentrifugeres ved 3500 g i 5 minutter. Vannfasen tas av og kastes. Dette gjentas med 1,0 ml 0,1 M HCl og med 1,0 ml H₂O. Den organiske fasen dampes til tørrhet under nitrogengass, ved 40 °C. Inndampingsresten løses i 100 µl acetonitril. Prøven sentrifugeres ved 3500 g i 5 minutter, overføres til autosamplerglass og analyseres i LC-MS/MS.

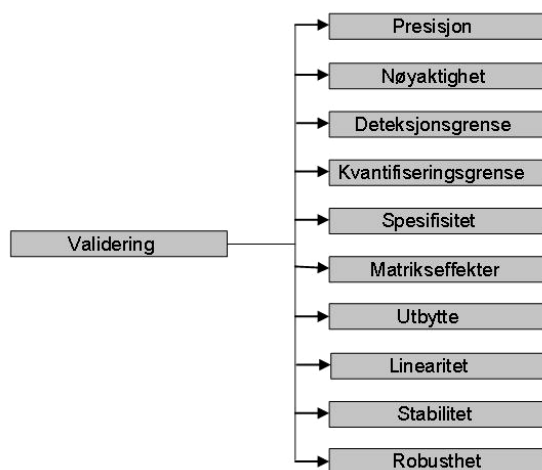


Figur 3-3. Fremgangsmåte for proteinfelling og enkel væske-væske-ekstraksjon av plasmaprøver

3.6 Validering

3.6.1 Introduksjon

Med validering menes at det skal dokumenteres at utstyret og analysemetodene som brukes er egnet til sitt formål. Validering utføres ved å kartlegge en rekke valideringsparametre, som vist i figur 3-4.



Figur 3-4. Valideringsparametre

Valideringen skal utføres etter retningslinjer gitt i ”Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation”, US FDA 2001 (23).

3.6.2 Kalibreringsmodell

En kalibreringskurve viser sammenhengen mellom analyseinstrumentets respons og den kjente konsentrasjonen av analytten. Det lages en kalibreringskurve for hver analytt. Antallet kalibratorer som skal brukes skal være tilstrekkelig for å gjenspeile forholdet mellom konsentrasjon og respons. Kalibratorene lages i den samme biologiske matriksen (plasma) som prøvene som skal analyseres, ved å tilsette en kjent konsentrasjon av analyttene. Kalibreringskurven bør bestå av 6 kalibratorer som dekker det forventede området for analysen, inkludert LLOQ. En blank prøve (opparbeidet blankt plasma uten intern standard), en nullprøve (opparbeidet blankt plasma med intern standard) skal også analyseres, men ikke inkluderes i kalibreringskurven. Kalibratorene bør fordeles utover konsentrasjonsområdet, men med høyest tetthet i det lave området.

Kvalitetskontrollene (QC) som skal brukes består av tre nivåer, lav, medium og høy konsentrasjon. Konsentrasjonen til den laveste kontrollen skal være LLOQ, mens den høyeste skal ligge tette opptil øvre kalibrator i standardkurven. Et vanlig krav til kalibrаторer er at de skal ha en variasjonskoeffisient (CV) bedre enn 15 % og nøyaktighet på 85-115%.

Konsentrasjon av kalibrаторer og kontroller er oppsummert over, i tabell 3-3. Standardkurvene vurderes med henblikk på stigningstall, skjæringspunkt og korrelasjon.

3.6.3 Presisjon

Presisjon bestemmes ved å analysere 4 replikater ved tre forskjellige konsentrasjoner. Det brukes her en pool av sammenslåtte plasmaprøver fra pasienter som blir behandlet med både MMF og glukokortikoider. Konsentrasjonen av denne poolen bestemmes innledningsvis, og fortynnes med blankt plasma til forskjellige konsentrasjonsnivåer, opprinnelig konsentrasjon, 50 % og 25 % av denne (100 %, 40 % og 10 % for metylprednisolon og metylprednison). Det lages en pool for prednisolon, prednison og MPA, en for kortisol og kortison, og en for metylprednisolon og metylprednison. Plasma til poolen for kortisol og kortison er hentet fra friske frivillige. Denne poolen blir ikke fortynnet til 50 % og 25 %, da fortynningsplasmaet også inneholder kortisol og kortison. Plasma til poolen for prednisolon, prednison og MPA er hentet fra pasienter noen dager etter transplantasjon, da de står på mykofenolat og høydose med steroider, men ikke får metylprednisolon. Plasma til poolen for metylprednisolon og metylprednison er hentet fra en pasient dagen etter transplantasjon, da vedkommende fortsatt blir behandlet med metylprednisolon.

Prøvene opparbeides som beskrevet, med proteinfelling, ekstraksjon og inndamping. Det er viktig at de fire replikatene er fire separate uttak av prøven, og at disse opparbeides separat. Det analyseres serier for å måle både innen-serie- og mellom-serie-variasjon. Mellom-serie-variasjon bestemmes på bakgrunn av fem serier. Kravene til presisjon er ved LLOQ en variasjonskoeffisient (CV) på mindre enn 20 %, mens den ved høyere konsentrasjoner bør være lavere enn 15 %.

3.7 Databehandling

Ved analyse på LC-MS/MS-instrumentet ble programvaren MassLynxTM (Waters) brukt. Kvantifisering og reprosessering av analysedata ble gjort ved hjelp av QuanLynxTM, som er en del av MassLynxTM.

4. Resultater

4.1 Betingelser i LC-MS/MS

4.1.1 Intern standard

Som interne standarder ble flumetason og deuteriummerket prednisolon (prednisolon-*d6*) valgt. Hvilken intern standard som skal brukes til hver av analyttene under reprosesseringen, er summert opp i tabell 4-1. Valget er delvis basert på tidligere publikasjoner der flumetason brukes som internstandard for kortisol, prednisolon og prednison, og delvis basert på resultat av reprosessering i QuanLynx[®] (19). For prednisolon og prednison ble derimot prednisolon-*d6* valgt, da disse er fysikalsk-kjemisk sett like. Hver av analyttene ble repossessert med både flumetason og prednisolon-*d6*. Den interne standarden som gir best kalibreringskurve er en god indikasjon på hvilken som bør velges, men det bør kjøres mange kalibreringskurver før det kommer tydelig frem hvilken intern standard som er den beste. Dette er foreløpig ikke gjort, så valget av intern standard er gjort delvis ut fra forsøk og delvis fra strukturmessige betraktninger og tidligere publiserte metoder.

Foreløpig brukes prednisolon-*d6* som intern standard for prednisolon, prednison, metylprednisolon og metylprednison, og flumetason for kortisol, kortison og mykofenolat (MPA).

4.1.2 Tuning

De generelle innstillingene til massespektrometeret som skal brukes i metoden er oppsummert i tabell 4-1.

Tabell 4-1. Parametre valgt ved tuning av instrumentet.

Ionekilde:		Analysator:	
Kapillærspenning (kV):	0,8	LM 1 oppløsning:	14
Cone-spenning (V):	Stoffspesifikk	HM 1 oppløsning:	14
Extractor (V):	3	Ioneenergi 1:	0,5
RF-linse (V)	0,1	Inngang:	2
Temperatur i ionekilden (°C):	120	Kollisjonsenergi (eV):	Stoffspesifikk
Tørketemperatur (°C):	400	Utgang:	2
Cone-gasshastighet (L/Hr):	50	LM 2 oppløsning:	14
Tørkegasshastighet (L/Hr):	900	HM 2 oppløsning:	14
		Ioneenergi 2:	0,5
		Multiplier:	650
		Sprøyte m/pumpe (µl/min)	10

Stoffenes fragmentering, cone-spenning og kollisjonsenergi er stoffspesifikk, og er oppsummert i tabell 4-2.

Tabell 4-2. Stoffenes fragmentering, cone-spenning og kollisjonsenergi.

Analytt	MS 1 (m/z)	MS 2 (m/z)	Cone-spenning (V)	Kollisjonsenergi (eV)
Prednisolon	361,2	147,0	22,0	22,0
Prednison	359,4	171,2	24,0	33,0
Kortisol	363,2	121,0	30,0	22,0
Kortison	361,2	163,1	35,0	22,0
Metyprednisolon	375,2	339,1	18,0	11,0
Metyprednison	373,5	185,2	20,0	25,0
Mykofenolsyre (MPA)	338,2	207,1	15,0	26,0
Flumetason	411,3	253,1	20,0	20,0
Prednisolon-d6	367,4	330,9	24,0	11,0

Monitoreringstid (dwelltime) er den tiden hver utvalgte masse blir monitorert, og den ble stilt inn på 0,100 sekunder. Inter-channel delay og inter-scan delay ble satt til 0,02 sekunder. Inter-channel delay er den tiden det tar fra slutten av monitorering av en masse til starten på den neste. Inter-scan delay er tilsvarende inter-channel delay, men er tiden mellom to scan.

Biologiske prøver inneholder mange komponenter som kan forurensse massespektrometeret. Så lenge disse ikke har betydning for analysen, kan de føres ut til avfall, for å unngå innføring av disse i massespektrometeret. Denne vekslingen kan reguleres gjennom en funksjon som kalles solvent delay. Analyttene i denne metoden eluerer litt før 1 minutt, og solvent delay innstilles da på en tid mellom 2 og 6 minutter. Alt som eluerer i dette tidsrommet føres ut som avfall. Dette bidrar til å beskytte massespektrometeret.

4.1.3 Ioniseringsteknikk

Glukokortikoidene er relativt hydrofobe, og inneholder ikke ioniserbare grupper. Til tross for dette viste tuningforsøk at positiv elektropray (ESI+) var den ioniseringsteknikken som gav best signalintensitet. I tillegg til ESI+ ble det gjort forsøk med ESI⁻, APCI+ og APCI⁻.

4.1.4 Mobilfase og kolonne

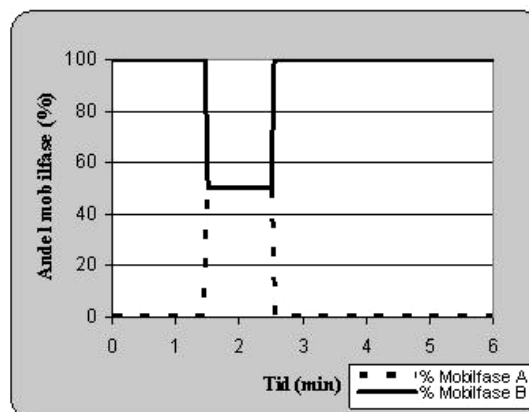
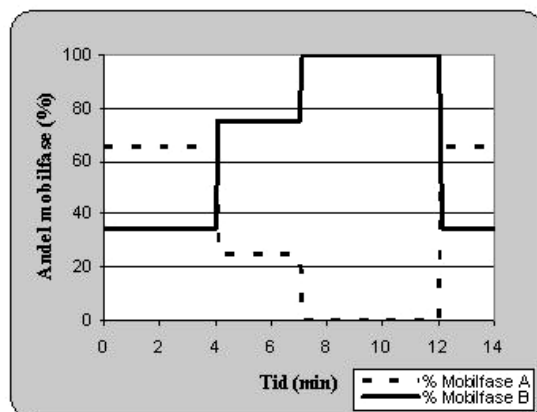
To forskjellige typer kolonner ble prøvd ut, Phenomenex[®] Luna C18 (2) og Waters Atlantis[®] HILIC. Innledningsvis var det Luna C18(2) som ble forsøkt. Gradienten som var best egnet til å retardere alle analyttene og flumetason, samt gi smale topper, på denne kolonnen er gjengitt i figur 4-1.

Analysetid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flowhastighet (µl/min)
0,00	65	35	400
3,90	65	35	400
4,00	25	75	400
7,00	25	75	400
7,10	0	100	400
11,90	0	100	400
12,00	65	35	400
14,00	65	35	400

Mobilfase A: Vann + 0,1 % maursyre + 2 mM ammoniumacetat
Mobilfase B: Metanol + 0,1 % maursyre + 2 mM ammoniumacetat

Analysetid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Flowhastighet (µl/min)
0,00	0	100	400
1,45	0	100	400
1,50	50	50	400
2,50	50	50	400
2,55	0	100	400
6,00	0	100	400

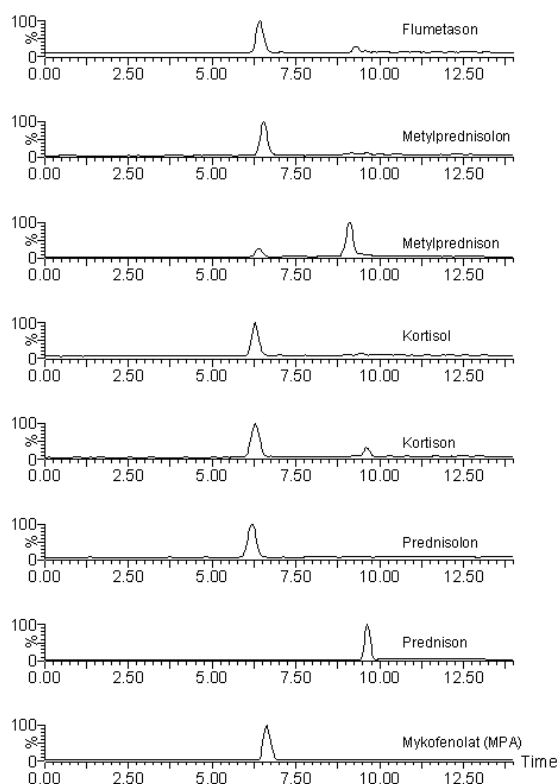
Mobilfase A: Vann + 0,2% maursyre + 10 mM ammoniumacetat
Mobilfase B: 95 % acetonitril + 0,2 % maursyre + 10 mM ammoniumacetat



Figur 4-1. Mobilfasegradient for Phenomenex® Luna C18(2)-kolonnen til venstre, og for Atlantis® HILIC-kolonnen til høyre.

For å oppnå retensjon av alle stoffene på Luna C18-kolonnen, var det nødvendig å starte mobilfasegradienten med 65 % vandig buffer (A) og 35 % buffer i metanol (B). Videre økes B til 75 %, og alle stoffene, med unntak av metylprednison og prednison, elueres ut etter ca. 6 minutter. Metylprednison og prednison er noe mer hydrofobe enn de øvrige stoffene, og er avhengige av 100 % B for å eluere. Disse eluerer etter mellom 9 og 10 minutter. Deretter ekvibreres kolonnen med 65 % A og 35 % B i 2 minutter, som er den sammensetningen som gradienten starter med. Kromatogrammene for hver av analyttene og flumetason er gitt i figur 4-2.

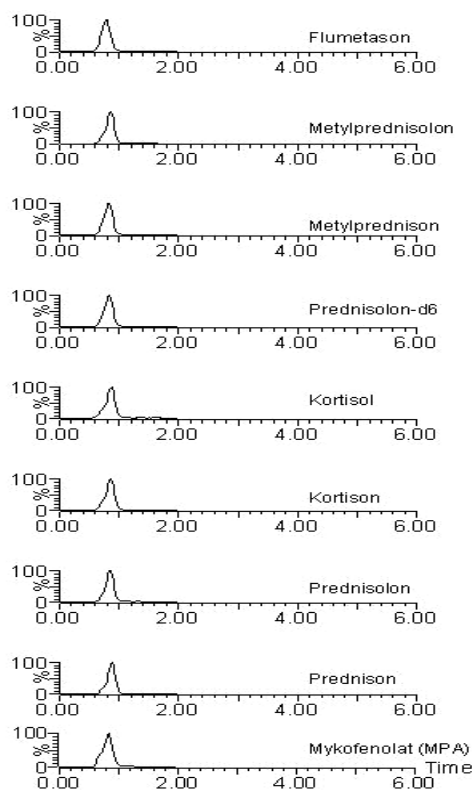
Til tross for smale og symmetriske topper, og god retensjon av analyttene, byr denne gradienten på problemer. Etter gjentatte forsøk med denne gradienten og kolonnen, var det betydelige carry-over-problemer med to av analyttene, metylprednison og prednison. Ved analyse av blanke prøver var det i kromatogrammene for begge disse analyttene topper med høy intensitet. Til tross for omfattende skylleprosedyrer, med ulike typer vaskeløsninger, tok det lang tid før de blanke prøvene gav helt blanke kromatogrammer.



Figur 4-2. Kromatogram for alle analyttene og flumetason, med gjeldende gradient på Phenomenex® Luna C18(2)-kolonnen. (I alle kromatogrammene er retensjonstiden i minutter vist på x-aksen, mens topphøyden er vist som respons på y-aksen, der kromatogrammets høyeste punkt settes som 100 %).

På grunn av problemene med metylprednison og prednison nevnt over, ble et annet separasjonsprinsipp forsøkt, med kolonnen Waters Atlantic® HILIC. Bakgrunnen for dette valget var å bruke en mobilfasegradient som ikke starter med et så høyt vanninnhold som gradienten for Luna C18(2)-kolonnen vist over. HILIC-prinsippet benytter samme løsningsmidler som i omvent-fase-kromatografi, mens elueringsrekkefølgen er som i normal-fase-kromatografi, dvs. at stoffene eluerer etter økende polaritet (13). MPA ved aktuell pH og glukokortikoidene er relativt hydrofobe, og vil dermed elueres ut tidlig, mens hydrofile forurensninger og plasmakomponenter elueres senere. Analyttene retarderes ikke på kolonnen og utgjør dermed en front, mens øvrige stoffer retarderes, og elueres senere. Analyttene separeres dermed fra øvrige hydrofile komponenter. Dette kan sees ut fra kromatogrammene fra matrikseffektforsøkene, avsnitt 4.1.5 og figur 4-4. HILIC-kolonnen skal derfor brukes i metoden.

Mobilfasegradienten til HILIC-kolonnen er gjengitt i figur 4-1. Ved 100 % B vil analyttene ikke retarderes til kolonnen, og dermed elueres. Hydrofile stoffer vil her retarderes. Først ved en økning av andelen vann til 50 % A, vil disse eluere. Kolonnen ekvilibrerer med 100 % B i tre minutter. Total analysetid per prøve er med denne gradienten 6 minutter. Et kromatogram for analyttene og de interne standardene er vist i figur 4-3.



Figur 4-3. Kromatogram for alle analyttene, flumetason og prednisolon-d6, med gjeldende gradient på Atlantis® HILIC-kolonnen.

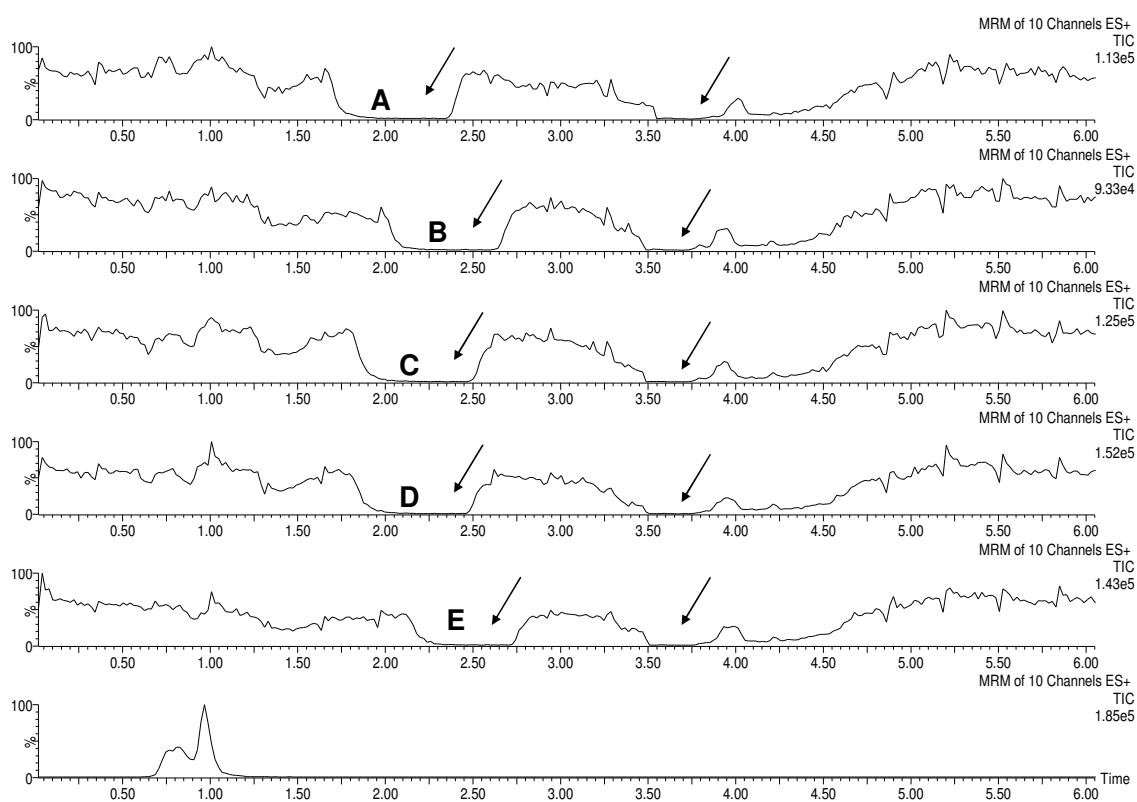
Flowhastighet ble etter enkle forsøk satt til 400 µl/min. I følge pakningsvedlegget til Atlantis® HILIC-kolonnen tåler den temperaturer mellom 20 og 45 °C, men det er ved romtemperatur kolonnen har lengst levetid. Derfor brukes romtemperatur for denne kolonnen.

4.1.5 Matrikseffekter

Under metodeutviklingen ble matrikseffektene undersøkt i et post-kolonne infusjonssystem, med opparbeidede, medikamentfrie plasmaprøver fra fem friske individer, A-E.

Retensjonstiden for analyttene ligger mellom 0,75 og 1 minutt, se TIC-kromatogram nederst på figur 4-4. I denne figuren kan ionsuppresjonen sees som en reduksjon i signalintensitet

(piler) i de fem øverste kromatogrammene. Tidspunktene for denne ionesuppresjonen sammenfaller ikke med analyttenes retensjonstid, noe som tyder på at de komponentene som bidrar til matrikseffekter retarderes bedre i HILIC-kolonnen enn analyttene, og dermed separeres fra analyttene. Sannsynligvis er signalsuppresjonen som sees rundt 2 minutter forårsaket av at andelen vann i mobilfasen økes til 50 %. Mye vann i mobilfasen fører til dårligere ionisering i ionekilden, da vann har høy overflatespenning. Forstøvningen av dråpene skjer derfor ikke i like stor grad. Reduksjonen i signalstyrke etter omtrent 3,5 minutter er trolig forårsaket av plasmakomponenter, da mobilfasen på dette tidspunktet består av 100 % B, som lett forstøves.



Figur 4-4. Matrikseffekter hos fem forskjellige individer, A-E, samt total ion current (TIC)–kromatogram for analyttene nederst.

4.1.6 Interferenser og carry-over

Kartlegging av interferenser og carry-over ble gjort i ett forsøk. Det ble injisert rene løsninger av analyttene enkeltvis, og respons i form av signalintensitet, ble målt for alle analyttene.

Ideelt resultat av dette forsøket hadde vært at det kun ble påvist respons for den analytten som ble injisert. I dette forsøket ble det identifisert interferens ved flere av analyttene, oppsummert i tabell 4-3. Mulige årsaker til disse interferensene diskuteres i avsnitt 5.5.4.

Tabell 4-3. Interferenser ved injeksjon av rene løsninger med analytter.

Injisert \ respons	Prednisolon	Prednison	Kortisol	Kortison	Metylprednisolon	Metylprednison	Flumetason	Prednisolon-d6
Prednisolon	262000	1270	1990	2370	-	-	-	-
Prednison	1750	33800	-	-	-	-	-	-
Kortisol	-	-	151000	-	-	-	-	-
Kortison	3920	-	758	69800	-	-	-	-
Metylprednisolon	747	764	-	-	812000	2220	-	-
Metylprednison	-	-	-	-	1850	59300	-	-
Flumetason	-	-	8640	-	-	-	94300	-
Prednisolon-d6	-	-	-	-	-	-	-	7450

I tillegg til å se på interferenser ble det testet om carry-over er et problem med denne metoden. Mellom hver injeksjon av analyttløsningene, ble det injisert ren acetonitril, som er det løsningsmiddelet analyttene ble løst i. Alle kromatogrammene ved disse blanke injeksjonene var uten målbar respons. Dette viser at selv ved så høye konsentrasjoner som her ble benyttet, er carry-over ikke noe problem.

4.1.7 Vaske- og skylleprosedyrer

Både mykofenolat og glukokortikoidene som skal inngå i analysen er lite løselige i vann, men stort sett godt løselig i metanol (22). Ved tillaging av stamløsningene viste det seg at analyttene også løste seg i acetonitril, som er det løsningsmiddelet som foretrekkes på HILIC-kolonnen. Det eneste unntaket for dette er metylprednison, der stamløsningen måtte lages i en blanding av acetonitril og metanol (5:1).

Mellom hver injeksjon i HPLC-systemet vaskes injeksjonsnålen for å unngå carry-over mellom prøvene. Da prednison og metylprednison er bedre løselig i metanol enn acetonitril, skal vaskeløsningen bestå av både acetonitril og metanol (1:1). Det viste seg i carry-overforsøket nevnt i avsnitt 4.1.6 at dette fungerte bra, da det ikke var noen carry-over mellom prøvene. Løsningen for skylling (purge) av injeksjonsenheten i HPLC-systemet skal inneholde 95 % acetonitril. Den brukes også til å fylle injeksjonsloopen ved injeksjon av prøven, for å hindre luftlommer på hver side av løsningen i loopen. Derfor bør den ha samme

sammensetning av løsningsmidler som prøven eluerer i, ellers kan toppene i kromatogrammene bli splittet.

Etter hvert prøveoppsett skylls hele systemet først med 50 % mobilfase A og B i 20 minutter. Dette gjøres for å skylle ut alle hydrofile forurensninger og prøvekomponenter. Deretter økes til 100 % mobilfase B i 20 minutter. Til slutt skylls det med 95 % acetonitril for å skylle ut hydrofobe stoffer. HILIC-kolonnen skal lagres med 95 % acetonitril.

4.2 Prøveopparbeidelse

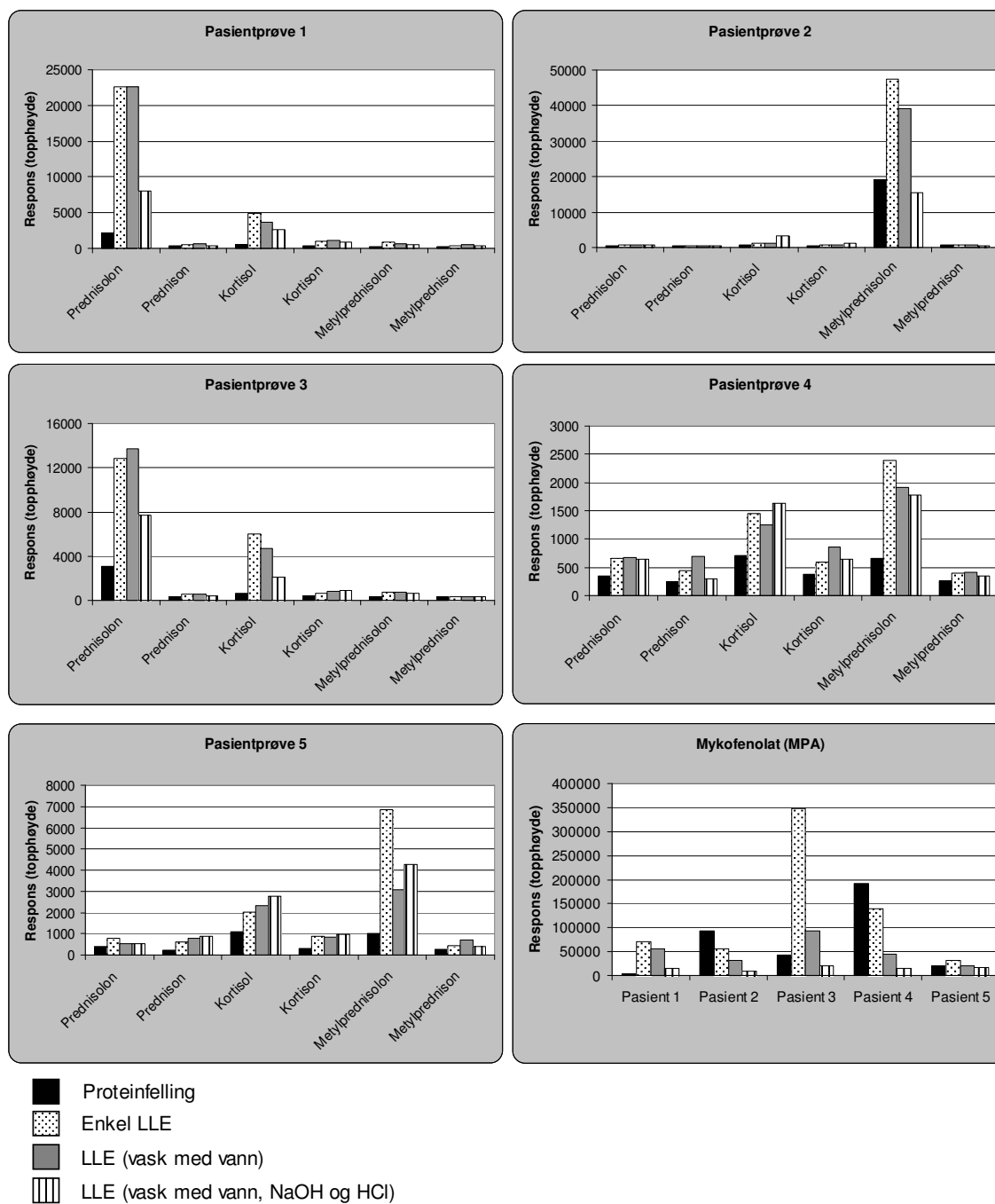
Fire prosedyrer for prøveopparbeidelse ble sammenlignet:

- Enkel proteinfelling
- Enkel væske-væske-ekstraksjon med diklormetan
- Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med vann
- Væske-væske-ekstraksjon med diklormetan og påfølgende vasking med vann, HCl og NaOH.

Sammenligningen skjer på bakgrunn av signalintensitet (topphøyde) for hver av analyttene ved hver av prosedyrene. Resultatet av denne sammenligningen oppsummeres i figur 4-5.

Man kan ut i fra dette forsøket få et inntrykk av hvilken prøveopparbeidelse som bør brukes. I diagrammene i figur 4-5 er gjennomsnittet av duplikatene. Det ble valgt å bruke prøver fra forskjellige pasienter, for å få med plasmaprøver med forskjellig innhold av prednisolon, kortisol og metylprednisolon.

For glukokortikoidene skiller enkel væske-væske-ekstraksjon (LLE) og LLE med etterfølgende vasking av vann seg ut fra de to andre. Det er ingen nevneverdig forskjell på signalintensiteten mellom disse, og av praktiske årsaker velges derfor enkel LLE, da dette er mer tidsbesparende og samtidig gir like godt resultat. Denne prosedyren er også egnet for MPA. Væske-væske-ekstraksjon med vasking med NaOH og HCl er ikke egnet for opparbeidelse av mykofenolatprøver, da MPA er en syre, og dermed vil vaskes bort ved tilsetning av base.



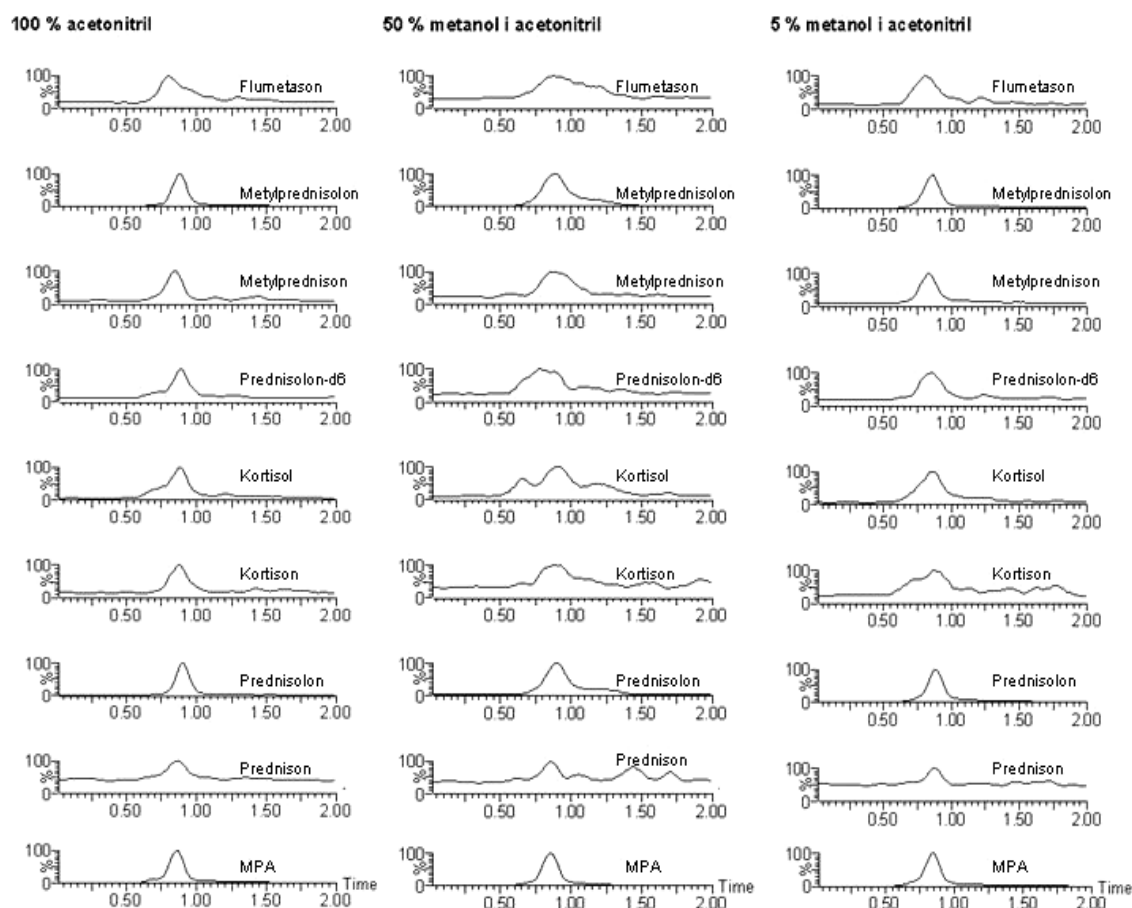
Figur 4-5. Sammenligning av fire alternative prøveopparbeidelser. Responsen til glukokortikoidene er vist i diagrammene "Pasientprøve 1-5", mens MPA er plottet i eget diagram.

Etter prøveopparbeidelsen dampes prøvene inn under nitrogengass ved 40 °C.

Inndampingsresten løses i 100 µl egnet løsningsmiddel. Optimalt løsningsmiddel ble funnet ved å sammenligne følgende:

- 100 % acetonitril
- 5 % metanol i acetonitril
- 50 % metanol i acetonitril

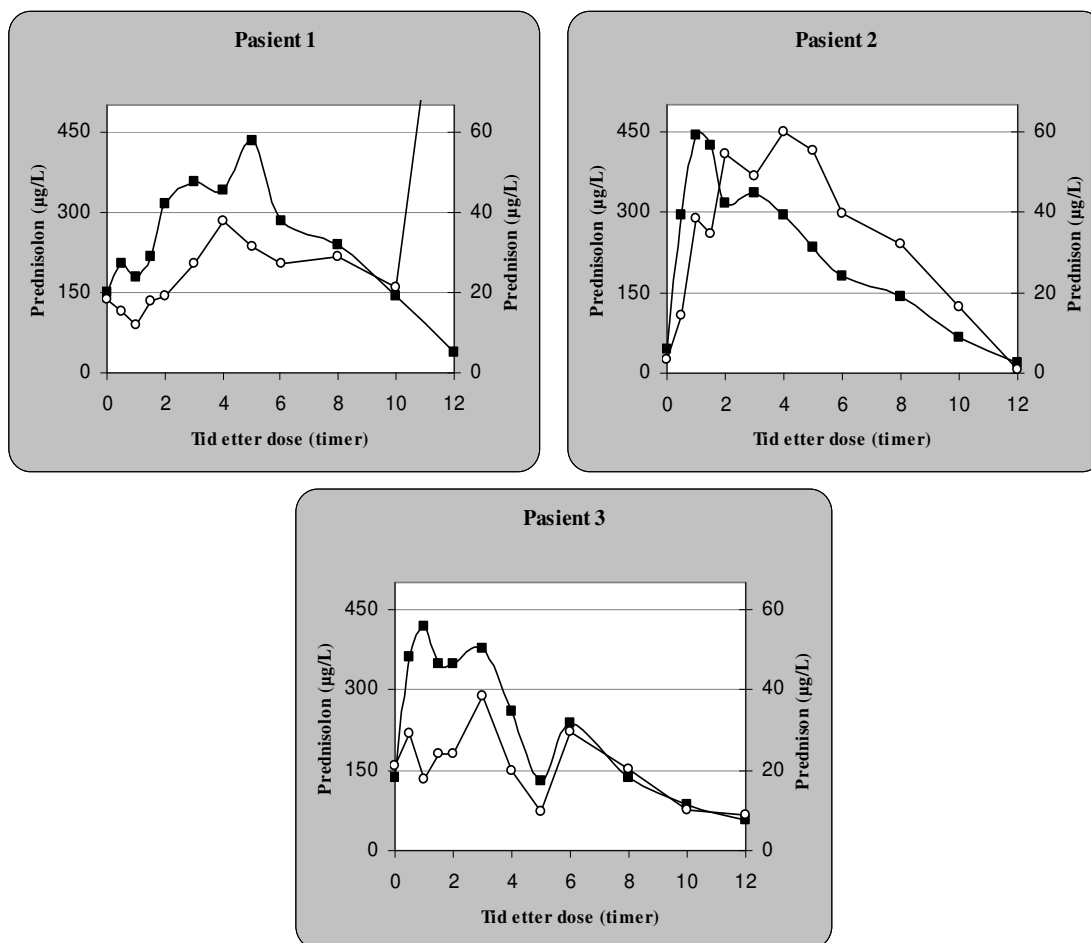
Forsøket ble gjort ved å opparbeide den høyeste kalibratoren (nivå 6) med proteinfelling og væske-væske-ekstraksjon, da dette er den valgte prøveopparbeidelsen. For hvert av de tre alternativene med løsningsmidler ble duplikater av kalibratoren analysert. Optimalt alternativ vurderes ut fra signalintensitet, symmetri og liten bredde på toppene i kromatogrammet. Ved bruk av metanol i kombinasjon med acetonitril, ble toppfasongen og signalintensiteten betraktelig dårligere enn ved 100 % acetonitril. Toppene ble brede, lave og uregelmessige, noe som reduserer metodens reproduserbarhet. Ved 5 % metanol i acetonitril ble toppene betraktelig bedre enn ved 50 % metanol i acetonitril, og omtrent like gode som ved bruk av 100 % acetonitril. Forskjellen ligger i at toppen til kortison ble best ved 100 % acetonitril, og resultatet av denne sammenligning ble derfor at inndampingsresten skal løses i 100 % acetonitril. Kromatogrammene er gjengitt i figur 4-6.



Figur 4-6. Sammenligning av løsningsmidler for løsning av inndampingsrest

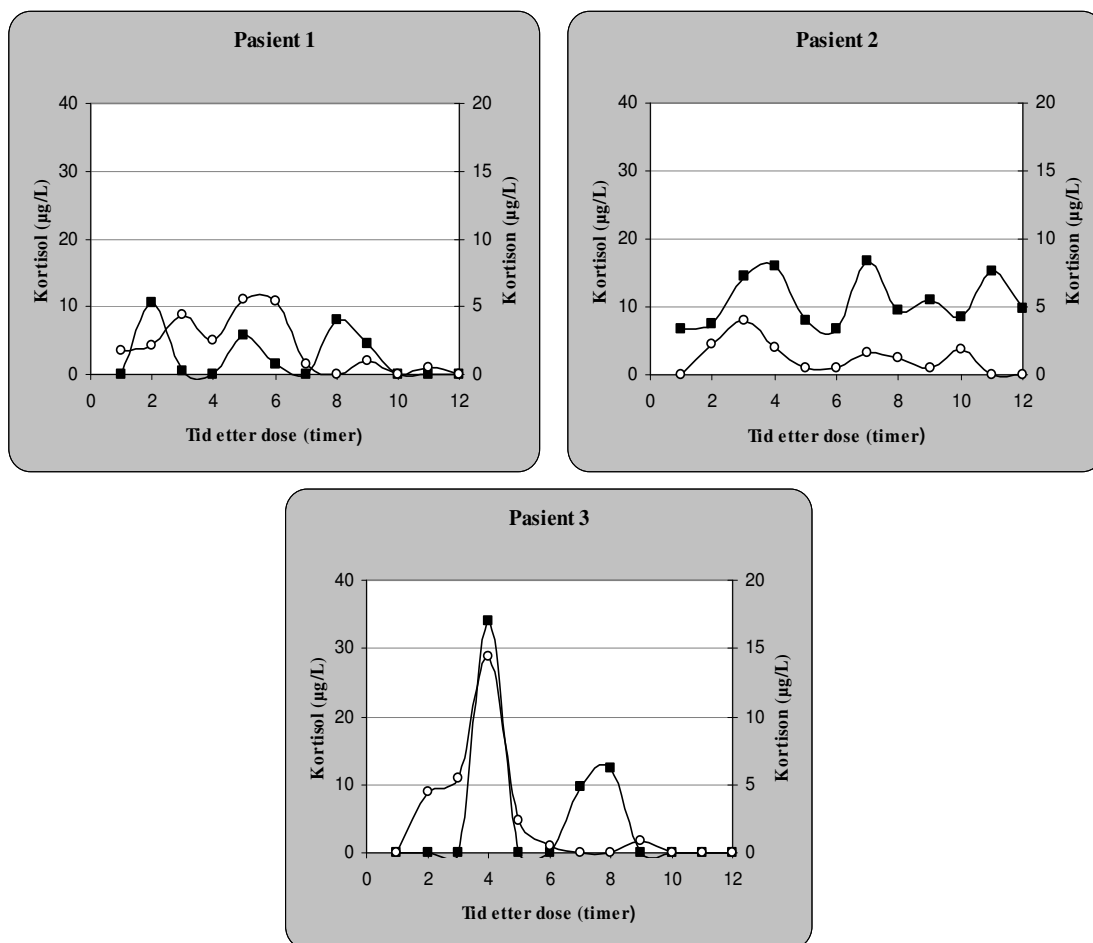
4.3 Resultater av pasientprøver/doseintervall

For å få et inntrykk av brukbarheten til metoden, før full formell validering startes, ble tre 12-timers doseintervall analysert. Forsøkene ble satt opp med kalibratorene og kontrollene beskrevet i avsnitt 3.2.3. Prøvene er hentet fra tre pasienter, omtrent 1 uke etter levertransplantasjon. Figur 4-7 viser dose-respons-kurvene for prednisolon og prednison til disse pasientene.

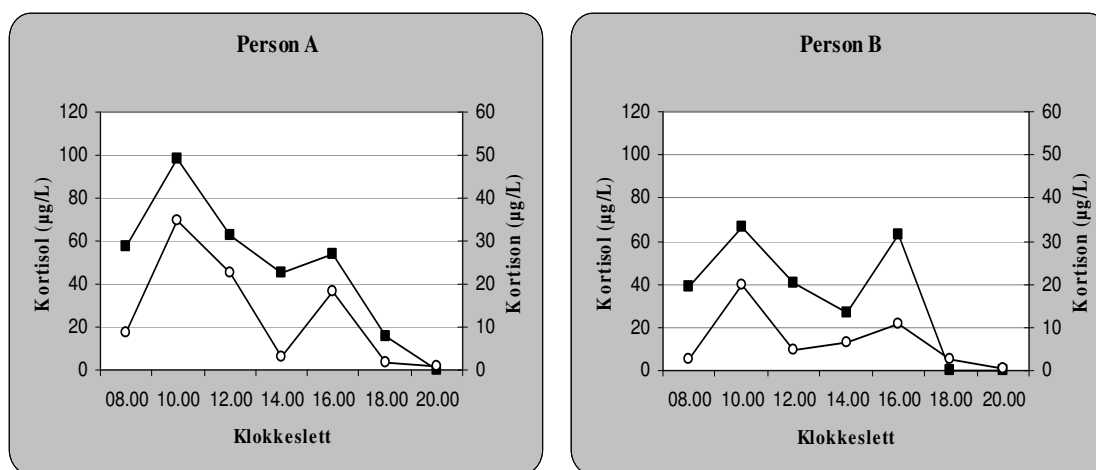


Figur 4-7. 12-timers doseintervall for prednisolon og prednison hos tre lever-transplanterte pasienter. (■ prednisolon, ○ prednison)

I tillegg til disse tre pasientene ble det også analysert plasmaprøver fra et 12-timers-intervall fra to friske personer. Disse personene hadde ikke fått noen legemidler, så hensikten med dette forsøket var å undersøke kortisol- og kortisonkonsentrasjoner gjennom 12-timer. Endogen kortisolproduksjon hos pasienter som behandles med systemiske glukokortikoider undertrykkes (5). Det måles derfor lave konsentrasjoner av kortisol og kortison i disse pasientprøveneprovne. For å få et inntrykk av normal kortisol- og kortisonkonsentrasjon, benyttes derfor plasmaprøver fra friske, frivillige personer. Resultatene kan også brukes til å se på forskjell i endogen kortisolproduksjon hos friske og hos pasienter som behandles med glukokortikoider, og dermed se på grad av binyrebarksuppresjon. Resultatet vises i figurene 4-8 og 4-9, og diskuteres nærmere i avsnitt 5.4.



Figur 4-8. Variasjon innen 12-timers dose-intervall for kortisol og kortison hos tre levertransplanterte pasienter. (■ kortisol, ○ kortison)



Figur 4-9. Variasjon innen 12-timers intervall for kortisol og kortison hos to friske, frivillige personer. (■ kortisol, ○ kortison)

4.4 Validering

4.4.1 Kalibreringsmodell

Kalibratorene som til nå har blitt benyttet er beskrevet i avsnitt 3.2.3. Etter analyse av pasientmateriale, viser det seg at kalibreringsområdet for enkelte av analyttene bør utvides. Dette diskuteres nærmere i avsnitt 5.5.1. Kalibreringsområdet utvides ved å øke konsentrasjonen på de to høyeste kalibratorene for de analyttene dette gjelder.

Analyseoppsettet som benyttes:

- Blank prøve med kun løsningsmiddel (acetonitril)
- Nullprøve, opparbeidet plasma med interne standarder
- Kalibratorer nivå 1-6
- Blank, opparbeidet plasma uten interne standarder
- Kontroller nivå 1-3
- Plasmaprøver som skal analyseres, (1- n)
- Kontroller nivå 1-3
- Skylleprosedyrer

Kalibreringskurver og resultater fra analyseserier av pasientprøver og prøver fra de friske frivillige, er gjengitt i Vedlegg 2.

4.4.2 Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ)

Av tidsmessige årsaker ble ikke nedre kvantifiseringsgrense bestemt i henhold til FDAs anbefalinger (23). Dette skal gjøres senere. Kvantifiseringsgrensen (LLOQ) defineres som den laveste konsentrasjon av analyttene som kan kvantifiseres med akseptabel presisjon. Det ble allikevel gjort noen betraktninger vedrørende bestemmelse av LLOQ ut fra presisjonforsøkene beskrevet i avsnitt 4.4.3. Dette diskuteres nærmere i avsnitt 5.5.3. Det er viktig å påpeke at dette ikke er den endelige bestemmelsen av LLOQ.

4.4.3 Presisjon

Innen-serie- og mellom-serie-presisjon ble estimert ved å gjøre gjentatte analyser av en pool med plasmaprøver hentet fra pasienter. Denne poolen ble fortynnet til tre ulike konsentrasjonsnivåer, og fire replikater ble analysert for hvert nivå, i fem dager. Resultatene fra disse forsøkene er oppsummert i tabell 4-4. Her er gjennomsnittet og variasjonskoeffisienten (CV) gjengitt for hver av seriene.

Tabell 4-4. Evaluering av innen-serie- og mellom-serie-presisjon ved analyse av glukokortikoider.

	Prednisolon (µg/L) n=4		Prednison (µg/L) n=4		Metylprednisolon (µg/L) n=4		Metylprednison (µg/L) n=4	
	Gj.snitt	CV (%)	Gj.snitt	CV (%)	Gj.snitt	CV (%)	Gj.snitt	CV (%)
Innen-serie-variasjon								
Nivå 1	274,2	7,0	32,2	10,6	*517,5	*10,6	*812,7	*9,7
	518,2	10,5	45,1	10,6	472,9	4,5	754,9	9,4
	365,3	27,7	29,8	37,5	412,1	9,3	848,1	6,6
	537,7	4,3	66,2	11,2	547,9	30,0	1066,8	20,5
	453,5	6,7	38,7	13,8	447,5	25,9	692,3	21,3
Nivå 2	189,3	6,9	27,6	26,2	211,2	7,3	182,4	17,4
	275,2	5,5	29,4	31,8	175,8	27,7	152,1	35,9
	204,4	3,2	18,6	23,8	84,8	19,2	185,7	14,4
	218,2	30,3	27,4	41,4	128,8	16,6	227,4	11,1
	206,5	16,3	17,6	39,4	102,9	20,1	167,1	18,7
Nivå 3	84,2	11,1	7,8	15,7	131,9	5,2	26,9	26,4
	96,2	26,5	*6,2	*42,5	133,0	3,5	49,5	26,1
	75,6	19,5	3,0	76,5	*9,5	*20,5	24,9	17,5
	111,3	12,8	5,6	61,9	40,8	11,2	50,5	21,2
	95,1	16,8	-	-	*23,9	*11,6	*36,8	*30
Mellom-serie-variasjon								
Nivå 1	429,7	26,1	42,4	34,8	477,6	20,9	836,1	21,3
Nivå 2	218,7	19,8	24,1	36,9	152,8	34,2	183,8	22,4
Nivå 3	92,5	21,0	5,0	62,6	75,7	70,8	37,8	37,6

	Kortisol (µg/L) n=4		Kortison (µg/L) n=4	
	Gj.snitt	CV (%)	Gj.snitt	CV (%)
Innen-serie-variasjon				
Nivå 1	131,2	25,7	19,2	44,9
	*106,9	*21,4	*15,7	*32,7
	103,4	22,7	20,8	33,1
	205,2	15,8	32,7	44,6
	111,1	17,5	17,4	27,0
Mellom-serie-variasjon				
Nivå 1	139,0	36,5	34,5	19,8

* n=3

CV, variasjonskoeffisient; n, antall prøver/paralleller

Det ble kun analysert ett nivå av kortisol og kortison.

5. Diskusjon

5.1 Strategi for metodeutviklingen

Det er tidligere publisert flere metoder for kvantifisering av glukokortikoider på LC-MS/MS (19-21,24-26). Ingen av disse metodene inneholder alle de 7 analyttene som er aktuelle i denne hovedfagsoppgaven, og ingen omfatter metylprednison. Helt nylig ble det publisert en LC-MS/MS-metode for en rekke glukokortikoider, MPA og MPAG (27). De publiserte metodene nevnt over skiller seg fra hverandre når det gjelder analytter, prøveopparbeidelse, kolonnevalg, mobilfase og valg av internstandarder. Et av fellestrekkene ved metodene er at de fleste har valgt å bruke omvendt-fase-kromatografi med en C18-kolonne. Dette ble brukt som utgangspunkt for metodeutviklingen.

Prøvematriks i analysen er plasma, og det er totalkonsentrasjonen av glukokortikoidene og mykofenolat som måles. Bakgrunnen for at det skal måles på totalkonsentrasjon og ikke fri fraksjon av legemidlene, er at det primære formålet med denne metoden er å bruke forholdet mellom aktive og inaktive glukokortikoider for å studere aktiviteten til enzymene hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 og 2. Til dette er det antagelig ikke nødvendig å måle fri fraksjon, da man antar at forholdet mellom totalkonsentrasjonene av aktivt og inaktivt glukokortikoid vil karakterisere enzymaktiviteten.

Det primære mål med metoden er analyse av glukokortikoidene. Det er imidlertid god grunn til å inkludere mykofenolat (MPA) i den samme metoden, hvis mulig. De fleste av pasientene som får reaksjonsprofylakse etter en transplantasjon, blir behandlet med både prednisolon og mykofenolat. Det vil derfor være en stor fordel å ha en analysemetode som dekker begge disse legemidlene. Strukturmessig og kjemisk sett skiller mykofenolat seg fra glukokortikoidene, og om det derfor er mulig å inkludere MPA i metoden er noe usikkert. Det skal derfor arbeides med i størst mulig grad å inkludere MPA, men fortrinnsvis uten å svekke analyse med hensyn på glukokortikoidene.

I tillegg til å måle totalkonsentrasjonen av MPA, vil en MS/MS-metode også gi mulighet for å måle fri konsentrasjon av MPA på grunn av økt sensitivitet i forhold til HPLC. Mandla *et al* (28) har publisert en metode basert på automatisert dialyse (ASTED), der konsentrasjoner av fritt MPA helt ned til 6 µg/L kan måles etter oppkonsentrering. Denne metoden er avhengig

av spesielt ASTED-utstyr, og analysetiden er 25 minutter. Kvantifisering av fritt MPA i samme metode som glukokortikoidene og totalkonsentrasjon av MPA, ville som nevnt være gunstig. Dette er avhengig av hvilken sensitivitet og LLOQ som kan oppnås ved ytterligere optimalisering.

5.2 Betingelser i LC-MS/MS

Som nevnt i avsnitt 4.1.4 var det problemer med carry-over med metylprednison og prednison i den første gradienten, da disse gav topper også ved injeksjon av blanke prøver.

Metylprednison er nærmest uløselig i vann, mens prednison er dårlig løselig i vann (22). Det er derfor sannsynlig at et høyt vanninnhold i mobilfasegradienten kan medføre utfellinger av disse. Disse utfellingene kan avgi stoff ukontrollert, noe som medfører at metylprednison og prednison blir detektert, selv om prøvene som analyseres ikke inneholder disse stoffene.

Lokalisering av de eventuelle utfellingene ble forsøkt ved å koble rundt forskjellige komponenter i LC-MS/MS-apparaturen. Disse omkoblingene og forsøkene viste ikke noen tegn til reduksjon av ekstratoppene i de blanke prøvene, så problemet var sannsynligvis relatert til injeksjon av prøven. Dette ble styrket av at når injeksjonsvolumet ble satt til 0 µl, var alle kromatogrammene blanke. Injeksjonsnålen i HPLC-apparatet ble byttet, men problemene vedvarte. Til tross for omfattende skylleprosedyrer, med ulike løsningsmidler, tok det lang tid før disse toppene forsvant. Etter hvert ble vaskeløsningen satt til acetonitril:metanol (1:1), som viste seg å være mest effektiv. For å unngå dette problemet, ble HILIC-kolonnen valgt fremfor C18-kolonnen. Dette er beskrevet i avsnitt 4.1.4.

C18-kolonnen som ble forsøkt innledningsvis var en såkalt "cartridge" på 20 mm. Fordelen med denne typen kolonne er at analysetiden blir kortere enn ved bruk av lengre, tradisjonelle kolonner. Ulempen med en "cartridge" er at når lengden reduseres, vil også separasjonsevnen reduseres. Hovedfunksjonen til denne kolonnen vil dermed være å skille analyttene fra fronten med løsningsmidler. Kromatografisk separasjon av analyttene er ingen nødvendighet i LC-MS/MS, da analyttene separeres ut fra masse og fragmenteringsmønster. Den eneste formen for kromatografisk separasjon som kan være nødvendig, er å separere analytten fra matrikskomponenter som gir opphav til matrikseffekter. Dette oppnås med HILIC-kolonnen, der analyttene eluerer ut først, deretter plasmakomponentene. En annen måte å unngå matrikseffekter på, er å ekstrahere bort disse matrikskomponentene under prøveopparbeidelsen. Forsøket der matrikseffektene ble undersøkt, ble gjort på et tidspunkt

der det kun ble utført proteinfelling på prøvene, før væske-væske-ekstraksjon ble benyttet. Hvorvidt alle disse matrikskomponentene ekstraheres bort under denne prøveopparbeidelsen, er usikkert. Dette vil komme frem fra valideringen, da matrikseffektene her skal bestemmes.

Det er forskjell mellom de publiserte metodene i hvilken ioniseringsteknikk som er valgt. Ut i fra de forsøkene som ble gjort for å finne mest egnet teknikk, kom ESI (+) best ut, og er derfor valgt for denne metoden. Teoretisk sett skal APCI være best egnet til nøytrale forbindelser, uten ioniserbare grupper, dvs. som for eksempel glukokortikoidene. Grunnen til at APCI ble funnet mindre egnet til å ionisere glukokortikoidene, kan være at mobilfasen som ble brukt under dette forsøket var mest tilpasset ESI(+). Mobilfasen ble valgt ut fra en tidligere publisert metode, og ESI(+) ble benyttet som ioniseringsteknikk (20). Det kan derfor hende at APCI gir like god resultater som ESI, dersom en mer tilpasset mobilfase hadde blitt brukt. I tillegg til denne mobilfasen, ble en mobilfase bestående av vann, metanol og 0,1 % maursyre (uten ammoniumacetat) forsøkt (25). Dette gav dårligere resultat. Av tidsmessige grunner ble det ikke forsøkt med et spekter av ulike mobilfasesammensetninger, men det ble ut fra litteraturen bestemt en mobilfasesammensetning som skulle prøves.

Ved valg av m/z -overganger som skal monitoreres, og valg av datterfragmenter, er det viktig å velge de overgangene som gir best spesifisitet, det vil si den som er mest mulig unik for hver analytt. Det bør derfor utvises forsiktighet ved valg av datterfragmenter med lav m/z , da mange analytter innen samme stoffgruppe kan fragmentere til disse. Et eksempel på dette er m/z 147, som vil være et fragment for flere steroider som ikke har substitusjon i C6, og m/z 161 for steroider som har en 6-metylgruppe. Forbindelser med en 11-hydroksylgruppe har en tendens til å fragmentere til m/z 97 og 109 (24). Da disse fragmentene er felles fragmenter for en stoffgruppe med en gitt kjemisk struktur, vil en analyse basert på disse ionene gi liten spesifisitet. Et annet eksempel på en lite spesifikk overgang, er [M-18]. En reduksjon av m/z med 18 tilsvarer avspalting av en hydroksylgruppe, som finnes på de fleste steroider.

M/z -overgangen som er valgt for prednisolon er $361,5 \rightarrow 147,0$. Hvorvidt denne kan benyttes eller ikke henger sammen med hvilken monitoreringsteknikk som benyttes. Her skal det kun analyseres på én spesiell overgang, og for at det skal skje interferenser mellom analyttene må både molekylionet og datterionet være det samme. Dette er faktisk tilfellet med kortison og prednisolon, da begge har samme molekylvekt. Da verken kortison eller prednisolon har substitusjon i C6, kan det derfor være sannsynlig at disse kan interagere med hverandre. Dette

kan være forklaringen på resultatet fra interferensforsøket i avsnitt 4.1.6, der det kom et signal for prednisolon når kortison ble injisert, og omvendt. Hvorvidt dette er forklaringen er ikke sikkert, da fragmentering er avhengig av cone-spenning og kollisjonsenergi. Men dette bør undersøkes ved å tune om og finne en ny m/z -overgang for prednisolon, og se etter interferenser med kortison med den nye overgangen.

5.3 Prøveopparbeidelse

Proteinfelling med påfølgende væske-væske-ekstraksjon (LLE) ble valgt som prøveopparbeidelse. Fordelen med proteinfelling er at det er en enkel og lite tidkrevende prøveopparbeidelse. I mange tilfeller er det tilstrekkelig å kun gjøre proteinfelling, før prøven analyseres. Svakheten med proteinfelling alene, er at dette er en grov prøveopparbeidelse, det vil si at den kun fjerner proteinene fra plasma, mens forurensninger og potensielle interferenser fortsatt er tilstede i prøven. I tillegg til dette fortynnes prøven, noe som er uheldig dersom konsentrasjonen av analytt i prøven allerede er lav. Ut fra figur 4-5 kan man se at signalintensiteten stort sett er en del lavere ved bruk av proteinfelling, sammenlignet med væske-væske-ekstraksjon.

Fordelen med væske-væske-ekstraksjon er at ekstraktene blir mye renere enn ved proteinfelling. Analyttene vil kunne skilles fra forurensninger og plasmakomponenter, som kan interferere med analysen. Ekstraksjon kan også bidra til å redusere matrikseffekter, da komponentene som forårsaker disse ekstraheres vekk (29). Renheten av ekstraktet kan bedres ytterligere ved å legge inn vaskeprosedyrer med enten vann, syre eller base. I tillegg til å fjerne uønskede komponenter fra matriks, kan det legges inn et oppkonsentreringstrinn i prøveopparbeidelsen, samt å få analytten over i egnet løsningsmiddel, som kan injiseres i analyseinstrumentet. Ulempen med væske-væske-ekstraksjon er at det er mer arbeidskrevende enn kun proteinfelling. Dessuten er LLE vanskelig å automatisere.

Bakgrunnen for valg av LLE i tillegg til proteinfelling, var problemer med sensitivitet i metoden. Det var derfor ønskelig å legge inn et oppkonsentreringstrinn. Med prøveopparbeidelse beskrevet i avsnitt 3.5, oppnås en oppkonsentreringsfaktor på 4.

Foreløpig, når antallet prøver fortsatt er relativt lavt, er det greit å bruke LLE. Men siden LLE er en manuell metode, og relativt arbeidskrevende, kan det på sikt være aktuelt å vurdere fast-

fase-ekstraksjon (SPE), som kan automatiseres. Andre fordeler med SPE er at det finnes et bredt utvalg av sorbenter til å ekstrahere med, noe som fører til god selektivitet. Forbruket av løsningsmidler vil også reduseres. SPE krever derimot dyrere og mer avansert utstyr enn LLE, noe som er en ulempe. Fast-fase-ekstraksjon kan også gjøres "online" i HPLC-systemet ved hjelp av kolonne-svitsjing med en oppkonsentreringskolonne og en analysekolonne. Ekstraksjonen automatiseres da via autoinjektoren og styringsenheten.

Etter proteinfelling og væske-væske-ekstraksjon skal prøven dampes til tørrhet under nitrogengass, og løses på nytt i 100 % acetonitril. I avsnitt 4.2 sammenlignes 100 % acetonitril, 50 % og 5 % metanol i acetonitril. Bakgrunnen for dette forsøket var at metylprednison er dårlig løselig i acetonitril, dette kom klart frem ved tillaging av stamløsningen. Metylprednison løste seg i 5 deler acetonitril og 1 del metanol. Tanken var da at litt metanol i acetonitril kunne vært gunstig for å løse inndampingsresten. Det ble dermed forsøkt med 5 % metanol i acetonitril, siden mobilfasen består av 95 % acetonitril. Ved sammenligningen viste det seg at dette hadde betydning, da toppene i kromatogrammene ble bredere. Til tross for dårlig løselighet av metylprednison i acetonitril, ble det valgt å benytte ren acetonitril til å løse inndampingsresten. Det var ikke nevneverdige forskjeller i signalintensitet for metylprednison ved bruk av ulike løsningsmidler, noe som kan tyde på at like mye blir løst i hvert av løsningsmidlene. Dårlig løselighet av metylprednison i acetonitril er et potensielt problem ved tillaging av stamløsning med høy konsentrasjon, mens ved lavere konsentrasjoner er løseligheten i acetonitril akseptabel.

5.4 Pasientprøver

Dagen etter transplantasjon startes steroidbehandling med en døgndose på 80 mg prednisolon peroralt. I løpet av den første uken etter operasjon trappes prednisolondosen gradvis ned fra 80 mg til 20 mg. Pasientene, der resultatene er beskrevet i avsnitt 4.3, ligger derfor i nedre del av nedtrappingsskjemaet. Nedtrappingen fortsetter ytterligere, og noen pasienter kan seponere prednisolon et års tid etter levertransplantasjon (3). Konsentrasjonene som måles for prednisolon og prednison hos disse pasientene måles greit med denne metoden, da man kan se at den fanger opp små svingninger i kurvene. Man kan også se en parallellforskyvning av prednisonkurven i forhold til prednisolon, noe som kan forklares med den omdannelsen som skjer av prednisolon til prednison via hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 2 in vivo, da

pasienten kun får prednisolon. Hos pasient 3 er dose-konsentrasjonskurvene mer synkrone i forhold til pasient 1 og 2. I tillegg ser man en økning i prednisolon og prednison etter 6 timer.

Det er foreløpig ikke blitt utført noen formell bestemmelse av LLOQ ved denne metoden, men det er sannsynlig at siden selv de laveste konsentrasjonene hos pasienter er såpass høye som de er, for både prednisolon og prednison, så befinner de seg over LLOQ. LLOQ skal bestemmes under valideringen av metoden, men er av tidsmessige grunner ikke med i denne hovedfagsoppgaven.

Det kan også sees ut fra prednisolonkurven til alle tre pasientene at C_{\max} ligger over 400 $\mu\text{g/L}$, som er konsentrasjonen til den høyeste kalibratoren. Kalibreringsområdet for prednisolon bør derfor utvides for å ha rom for også å kunne måle plasmakonsentrasjoner til pasienter som får opp til 80 mg prednisolon. Plasmakonsentrasjonen til pasienter som får 80 mg prednisolon bør dermed analyseres, for å få et inntrykk av hvor mye kalibreringsområdet for prednisolon bør utvides. Owen *et al* har valgt å kalibrere opp til 1000 $\mu\text{g/L}$ for prednisolon (20).

5.5 Validering

5.5.1 Kalibreringsmodell

Som nevnt i avsnitt 2, er et av formålene med denne analysemetoden å se på forholdet mellom de aktive og inaktive formene av glukokortikoider, og senere kunne relatere dette til aktiviteten til enzymene hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 og 2.

Konsentrasjonsområdet for de ulike analyttene vil variere avhengig av dose og farmakokinetikk av legemiddelet. For de tre metabolittene kortison, prednison og metylprednison kan det forventes at konsentrasjonsområdet som det er aktuelt å måle i, ligger betraktelig lavere enn for tilsvarende aktivt steroid. De endelige måleområdene kan man først få et inntrykk av etter å ha analysert en rekke pasientprøver, og de må justeres etter hvert. Konsentrasjonsnivåene på de ulike løsningene som brukes underveis i metodeutviklingen bør gjenspeile de aktuelle nivåene i en viss grad, og de velges derfor ut fra farmakologiske betraktninger og publiserte data.

Som diskutert i avsnitt 5.4 kan det se ut til at kalibreringsområdet for prednisolon bør utvides. Czock *et al* beskriver i sin oversiktsartikkel doseavhengig farmakokinetikk for prednisolon, administrert peroralt. Ved doser på under 20 mg vil gjennomsnittlig C_{\max} ligge på 20,7 $\mu\text{g/L} \pm$

6,5 per 1 mg dose prednisolon. Tilsvarende tall for 25-60 mg prednisolon er $16,3 \mu\text{g/L} \pm 3,5$, og for 100 mg prednisolon $11,1 \mu\text{g/L} \pm 6,0$ (5). Konsentrasjonen av prednisolon som ble målt i de to doseintervallene, avsnitt 4-3, virker derfor rimelige, og kalibreringsområdet for prednisolon bør økes til $1000 \mu\text{g/L}$, som beskrevet hos Owen *et al* (20).

Når det gjelder prednison har pasientene som er beskrevet i figur 4-7, en C_{max} mellom 40 og $60 \mu\text{g/L}$. Det sees da bort fra 12-timers-prøven til pasient 1, som har en konsentrasjon på $130 \mu\text{g/L}$. Denne kraftige økningen sees i forbindelse med at pasienten får rejeksjonsbehandling med metylprednisolon intravenøst. Hvorvidt omdannelsen av metylprednisolon til prednison skyldes metabolisme *in vivo* eller under selve analysen er usikkert, men i følge interferensstudiene som ble gjort ser det ut til at denne omdannelsen skjer i liten grad analytisk. For å undersøke dette funnet nærmere, bør det analyseres plasmaprøver fra pasienter med høy konsentrasjon av metylprednisolon, og undersøke om denne omdannelsen til prednison skjer hos alle disse pasientene. Dersom dette kun gjelder noen pasienter, kan man se på hva som karakteriserer disse pasientene. Det kan derfor tenkes at dette kan ha med forskjeller i metabolisme å gjøre, men dette er kun spekulasjoner.

Når det gjelder kalibreringsområdet til prednison, ser det ut til at det bør utvides i samme grad som området for prednisolon. Bakgrunnen for dette finnes hos pasienter som behandles med høyere prednisolondoser enn disse tre pasientene, for eksempel med 80 mg, der prednisonkonsentrasjonen sannsynligvis vil øke proporsjonalt med økningen i prednisolonkonsentrasjonen.

Kalibreringsområdet for kortisol ble satt ut fra hva som er vanlig plasmakonsentrasjon av kortisol hos friske individer. Vanlig plasmakonsentrasjon av kortisol ligger på sitt høyeste om morgenen, på rundt $160 \mu\text{g/L}$ (4). Omdanningen fra kortisol til kortison er ikke karakterisert i forsøk ennå, da prøvene som ble brukt stammer fra pasienter som får relativt høye steroiddoser. Dette fører til suppresjon av egenproduksjon av kortisol, noe som fører til lave konsentrasjoner av kortisol, og enda lavere av kortison (5). Ut fra normalproduksjon hos friske ble det for kortisol valgt å kalibrere opp til $200 \mu\text{g/L}$. Øvre kalibrator for kortison derimot ble satt til $100 \mu\text{g/L}$. For å finne ut om de kalibreringsområdene som er valgt for kortisol og kortison er godt egnet, bør det analyseres prøver fra flere personer som ikke er under steroidbehandling.

Metylprednisolon gis intravenøst under operasjonen i doser på 500 mg. Kalibreringsområdet for metylprednisolon må sannsynligvis også justeres. For å få et inntrykk av i hvilken størrelsesorden plasmakonsentrasjonen metylprednisolon og metylprednison befinner seg, bør det analyseres prøver fra flere nytransplanterte pasienter eller pasienter som får metylprednisolon ved reaksjonsbehandling. Resultatene fra presisjonsforsøkene beskrevet i avsnitt 4.4.3 viser at konsentrasjonsområdet av metylprednisolon, for denne pasienten, ligger mellom 400-600 µg/L, og opp mot 1000 µg/L for metylprednison. Dette skiller seg betraktelig fra det kalibreringsområdet som ble valgt for disse analyttene. Prøvene som ble brukt til dette forsøket ble hentet fra en pasient dagen etter transplantasjon. På operasjonsdagen får pasienten høy dose metylprednisolon (500 mg) og 40 mg postoperativt påfølgende dag. Prøvene ble hentet noen timer etter sistnevnte dose. Plasmakonsentrasjonen av metylprednisolon vil derfor være relativt lav, sett i forhold til hva den ville vært på operasjonsdagen. Det er derfor sannsynlig at klinisk relevante plasmakonsentrasjoner av metylprednisolon og metylprednison vil være vesentlig høyere enn de som ble målt under presisjonsforsøkene. For å få et bedre bilde av hvilke konsentrasjonsområder det er aktuelt å kalibrere i, bør prøver fra flere pasienter, ved ulike tidspunkter etter behandling med metylprednisolon derfor analyseres. Dette er forsøk som står igjen. De kalibreringsområdene som er valgt for analyttene, er derfor midlertidige, og skal justeres.

Kalibreringsområdet for mykofenolat (MPA) er det samme som ved den etablerte HPLC-UV-metoden som kjøres som rutineanalyse ved seksjonen. De samme kalibratorene er valgt, men kombinert i samme kalibrator som de øvrige analyttene.

Ved repressering av kalibreringskurvene og prøveresultatene ble topphøyden i kromatogrammene brukt. Ved kvantifisering av pasientprøver, i de ulike forsøkene, har det blitt forsøkt å repressere med henblikk på både topphøyde og areal. Det varierte fra forsøk til forsøk hva som var optimalt. Derfor er det noe tilfeldig at det ble valgt å benytte topphøyde under represseringen av resultatene presentert i denne oppgaven. Før man bestemmer endelig hvorvidt areal eller topphøyde skal benyttes, bør det systematisk analyseres en rekke serier med prøver. Disse bør represseres ut fra både topphøyde og areal, og presisjon og nøyaktighet sammenlignes.

I vedlegg 3 er kalibreringskurvene for alle analyttene, fra en av seriene i presisjonsforsøkene gjengitt. Kurvene er tilfeldig utvalgt, og representative for de øvrige kalibreringskurvene. De fleste av dem er akseptable, med en korrelasjonskoeffisient (r^2) på opptil 0,995. De dårligste av dem har en $r^2 = 0,822$ og $0,887$, for henholdsvis kortisol og prednison. Konsentrasjonen av kortisol og prednison i det nedre kalibreringsområdet er lave, helt ned til 5-10 µg/L. Hvorvidt dette er under nedre kvantifiseringsgrense er usikkert. Men ved så lave konsentrasjoner er presisjonen dårlig, noe som fører til spredning i analyseresultatene i det lave kalibreringsområdet. Dette kan føre til en dårligere kalibreringskurve.

5.5.2 Presisjon

Det skilles mellom innen-serie- og mellom-serie-presisjon. Ved validering av innen-serie-presisjon vurderes variasjonen mellom flere tilsvarende prøver, innen samme analyseserie og kalibrering, samme dag. Ved validering av mellom-serie-presisjon vurderes variasjonen av prøver mellom ulike analyseserier. Mellom-serie-presisjon omtales gjerne som den totale variasjonen for en analysemetode, da den tar høyde for spredning i analyseresultatene som fremkommer når samme prøve analyseres på samme laboratorium, ofte på forskjellige dager med forskjellige operatører, samt andre faktorer som kan ha innvirkning. Variasjonen presenteres gjerne ved hjelp av en variasjonskoeffisient (CV), i prosent. Den regnes ut på følgende måte:

$$CV (\%) = \frac{\text{Standardavvik} * 100 \%}{\text{Gjennomsnitt}}$$

Krav til presisjon i en bioanalytisk metode er en variasjonskoeffisient på $< 15 \%$, og $< 20 \%$ ved nedre kvantifiseringsgrense. Som man kan lese ut fra tabell 4-5, tilfredsstillers ikke denne analysemetoden disse kravene. Variasjonskoeffisienten mellom seriene spenner fra $19,8 \%$ til $70,8 \%$, avhengig av hvilken analytt gjelder og i hvilket konsentrasjonsområdet det måles. Som forventet øker impresisjonen ved en reduksjon i analyttkonsentrasjon. De mest ekstreme variasjonskoeffisientene er målt på det laveste konsentrasjonsnivået av prednison og metylprednison, med henholdsvis en CV på $62,6 \%$ og $70,8 \%$. For metylprednisolon er de opprinnelige plasmaprøvene fortynnet 10 ganger. Disse prøvene er samlet dagen etter transplantasjon og en 500 mg dose med metylprednisolon. Noen timer før prøvetaking fikk pasienten 40 mg metylprednisolon. Plasmakonsentrasjonen av metylprednisolon er da allerede før fortynning relativt lav, og det er derfor sannsynlig at dette er et konsentrasjonsområde det

ikke er aktuelt å måle i. Men presisjonen bør allikevel forbedres. De øvrige seriene gir en CV mellom 19,8 % og 37,6 %, noe som også er for høyt.

Innen-serie-presisjonen ble også evaluert, med variasjonskoeffisienter fra 3,2 % som er akseptabelt, til 44,9 % som ikke akseptabelt. For de fleste seriene ligger variasjonen på under 20 %. Mellom-serie-presisjon er et bedre mål enn innen-serie-presisjon på den totale presisjonen i en analysemetode, da den tar høyde for en rekke andre faktorer som spiller inn.

Mykofenolat (MPA) er ikke tatt med i bestemmelsen av presisjon. Bakgrunnen for dette er at metoden ikke er ferdigutviklet for MPA ennå. Det er derfor ikke hensiktsmessig å vurdere presisjonen av MPA på dette tidspunktet i metodeutviklingen.

5.5.3 Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ)

Kvantifiseringsgrensen (LLOQ) defineres som den laveste konsentrasjon av analyttene som kan kvantifiseres med akseptabel presisjon. LLOQ er et kompromiss mellom konsentrasjon og presisjon. Normalt øker spredningen i analyseresultatene når konsentrasjonene av analytt blir lave. Noen bruker signal-til-støy-forhold (S/N-ratio) for å bestemme deteksjonsgrensen (LLOD) og kvantifiseringsgrensen (LLOQ). Deteksjonsgrensen blir da ofte definert som $S/N = 2$ eller 3 og $S/N = 10$ som kvantifiseringsgrense (12). I følge retningslinjer gitt av US Food and Drug Administration bør presisjon og nøyaktighet ligge i bunn for bestemmelse av kvantifiseringsgrensen (23). S/N-forhold gir i større grad et bilde av sensitiviteten til analysemetoden, enn kvantifiseringsgrensen. Til tross for S/N på over 10, er det ikke sikkert at presisjonen og nøyaktigheten er akseptabel ved denne konsentrasjonen. Dette henger ikke nødvendigvis sammen. FDAs krav ved LLOQ er en variasjonskoeffisient på mindre enn 20 %, og en nøyaktighet på 80-120 %. Responsen til analytten skal dessuten være minst fem ganger så høy som blank respons. Tanken var at man ut fra presisjonsforsøkene i avsnitt 4.4.3 kunne få et inntrykk av omtrent hvor det kunne forventes at LLOQ ligger. Da mellom-serie-presisjonen var for dårlig ved alle konsentrasjonsnivåene som ble målt, må bestemmelsen av LLOQ skje etter at metoden er optimalisert. Det kan på nåværende tidspunkt derfor ikke sies noe om nedre kvantifiseringsgrense.

5.5.4 Interferenser og carry-over

Ved både interferenser og carry-over måles uønsket respons av ulike stoffer ved analyse av prøvene. Forskjellen på begrepene interferens og carry-over ligger i hvordan de ulike stoffene tilføres prøvene. Med carry-over menes at rester fra en tidligere prøve overføres til en annen prøve og kontaminerer den, og dermed har innvirkning på fortolkningen av analyseresultatet. Med interferenser menes gjerne andre faktorer som har innvirkning på den målte responsen av en analytt. Eksempler på dette kan være den biologiske matriksen som brukes i analysen inneholder endogene stoffer, som gir samme respons som analytten. Det kan også tenkes at enkelte stoffer omdannes til analytten, gjennom kjemiske modifikasjoner, og dermed gir økt respons i analysen. Uspesifikke m/z -overganger kan også gi interferens i analysen. Dette vil gi et forhøyet analyseresultat.

Som resultatene i avsnitt 4.1.6 viser, ble det ikke funnet carry-over mellom prøvene, til tross for injeksjon av relativt høye konsentrasjoner av analyttene. Interferenser ble derimot observert. Dette gjaldt spesielt ved injeksjon av prednisolon. Her var det også respons ved prednison, kortisol og kortison. Mellom metylprednisolon og metylprednison var det også interferenser. Disse interferensene kom også til syne ved analyse av plasmaprøver. Årsaken til disse interferensene ble forsøkt utredet. Dette ble gjort blant annet ved å analysere fellingsreagenset og acetonitril som ble brukt under analysen, for å utelukke at disse var kontaminert. Disse var ikke kilde til interferensene. En mulig forklaring på interferensene mellom kortison og prednisolon kan være m/z -overgangen som er valgt for monitorering av prednisolon, m/z 361,2 \rightarrow 147,0. Kortison har samme molekylvekt som prednisolon, og fragmentet 147,0 kan regnes for å være uspesifikt, da flere glukokortikoider kan fragmentere til dette. Hvorvidt dette er forklaringen, er usikkert. Dette skal undersøkes nærmere.

En annen forklaring på problemet kan være renheten av råvarene som er brukt til å lage stamløsninger. Hvis man ser på responsen til interferensene i forhold til analytten som blir injisert, utgjør dette 1-5 %. Råvarene har ulik renhet, men er deklartert med renhet mellom 95 % og 99,9 %. Analyttene er strukturmessig veldig like. Det kan derfor tenkes at råvaren blir forurensert med beslektede steroider ved syntese av disse stoffene. For å undersøke dette nærmere, ble det analysert fortynninger av de opprinnelige løsningene brukt i interferensforsøket. Det ble fortynnet til 50 % og 25 %, og signalintensiteten til analyttene og interferensene ble tilsvarende redusert. Dette tyder på at det ikke er forurensninger eller kontaminasjon i LC-MS/MS-en, noe som også ble bekreftet ved fravær av carry-over.

Dersom dette problemet vedvarer, og toppene til interferensene er reproducerbare, kan man omgå dette ved å korrigere for dette ved kalibrering. Dette vil da ikke gå ut over presisjonen i metoden, men nøyaktigheten vil bli feil. Siden kalibratorene da har en for høy konsentrasjon av analyttene, vil kalibreringskurven være parallell, men ligge høyere enn den ideelle kalibreringskurven (skjærer y-aksen ved høyere verdi). Ved bruk av denne kalibreringskurven vil dette derfor gi en for lav konsentrasjon av analytten. Disse interferensene er også et argument for å bruke separate kalibratorer og kontroller for hver analytt, i stedet for felles kalibratorer og kontroller for alle analyttene. Problemet med disse interferensene vil da unngås, dersom det er renheten av råvarene som er kilden til problemet. Kalibratorene bør også valideres, for å undersøke stabiliteten av alle analyttene sammen i én kalibrator.

5.6 Annet

5.6.1 Hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase (HSD11B)

Et av hovedformålene med utviklingen av denne metoden, er å bruke den til å studere forholdet mellom aktive og inaktive glukokortikoider *in vivo*, og dermed relatere dette til aktiviteten til isoenzymene hydroksysteroid (11-beta) dehydrogenase (HSD11B) 1 og 2. Som nevnt i avsnitt 1.2.5 uttrykkes HSD11B-enzymene i forskjellig grad i de ulike vevene, avhengig av hvilken funksjon de har. Dette vil komplisere bildet i plasmaprøvene, da det er vanskelig å si i hvilken grad dette gjenspeiler aktiviteten av disse enzymene i de ulike vevene. Ratio mellom konsentrasjon av aktiv og inaktiv form av steroidet i plasma kan brukes til å undersøke om det er interindividuelle forskjeller i omdannelsen mellom aktiv og inaktiv form. I kommende studier er det ønskelig å korrelere dette til eventuelt forskjellige genetiske varianter og polymorfe former av disse enzymene. Det kan dermed tenkes at individer med forskjellige genetiske varianter får forskjellig effekt og bivirkninger av glukokortikoidene, da det er forskjeller i konsentrasjon av aktivt glukokortikoid.

5.6.2 Kortisolfritt plasma

Ved tillaging av kalibratorer og kontroller, og ved behov for blankt, legemiddelfritt plasma, brukes Octaplas-plasma. Selv om dette plasma er legemiddelfritt, vil det jo allikevel inneholde endogent kortisol og kortison. Dette vil derfor forstyrre analysen, da målt kortisol- og kortisonkonsentrasjon i kalibratorer og kontroller vil være for høy. Dette kan omgås på forskjellige måter. Det kan kjøpes plasma der kortisol og kortison er fjernet. Man kan

ekstrahere kortisol og kortison fra plasmaet selv. Eller man kan bruke plasmaet som det er, og korrigere for konsentrasjonen av kortisol og kortison.

Sistnevnte justering kan gjøres ved å analysere en rekke replikater, og dermed kvantifisere kortisol og kortison i dette plasmaet. Dette kan i neste rekke trekkes fra resultatene for kontrollene og kalibratorene. Problemet med dette igjen, er da at den målte kortisol- og kortisonkonsentrasjonen i det legemiddelfrie plasmaet er for lav, da kalibreringskurven som ble brukt til kvantifiseringen baserer seg på kalibratorene som da allerede har for mye kortisol og kortison.

Luo *et al* valgte å fjerne kortisol og kortison ved hjelp av ekstraksjon med metyl-*tert*-butyleter (MTBE) (26). Dette kan være problematisk, da MTBE i tillegg vil ekstrahere bort en rekke andre lipofile plasmakomponenter. Sammensetningen av plasmaet som da skal brukes i kalibratorene og kontrollene er da forskjellig fra plasmaprøver fra pasienter. Hvorvidt disse kalibratorene da er egnet for å kvantifisere plasmaprøvene er derfor usikkert, da kalibratorene ikke nødvendigvis gir samme respons som plasmaprøvene for de samme konsentrasjonene.

5.6.3 Inkludering av mykofenolat i metoden

Fysikalsk-kjemisk og strukturmessig skiller mykofenolat seg fra glukokortikoidene. Det kan derfor være en utfordring å inkludere mykofenolat i samme metode som glukokortikoidene. Mykofenolsyre (MPA) har pK_a på 4,5. Med den pH-en som er i den aktuell mobilfasen (pH 3-4), vil syren være protonert, og dermed relativt lipofil (22). MPA er et relativt lipofilt molekyl, og det viser seg i forsøkene at MPA eluerer samtidig som glukokortikoidene. Flumetason er valgt som intern standard ved analyse av MPA. Flumetason er et steroid, og dermed strukturmessig en del forskjellig fra MPA. Dette kan være uheldig, da flumetason og MPA kan oppføre seg forskjellig under prøveopparbeidelsen, kromatografien og ioniseringen. Det kan derfor være aktuelt å forsøke med en annen intern standard. DiFrancesco *et al* har brukt 5,5-difenylyhydantoin (fenytoin) som intern standard for MPA og glukuronidet til MPA (MPAG), mens de har brukt flumetason til glukokortikoidene (27). Denne metoden er publisert nå helt nylig, i september 2007, og omfatter både MPA, MPAG, prednisolon, prednison, metylprednisolon og kortisol. De har derimot ikke med kortison og metylprednison, noe som skiller metodene når det gjelder analytter. De har inkludert både MPA og MPAG i metoden, noe som da tyder på at det også er mulig i min metode, men en del modifikasjoner må gjøres. Det ble sammenlignet resultater fra MS/MS-metoden med

analyse av MPA på en etablert HPLC-UV-metode ved seksjonen. 12-timers doseintervall fra de samme tre pasientene som nevnt i avsnitt 4.3 ble analysert.

MPA-konsentrasjonene fra MS/MS-metoden er betraktelig lavere enn ved bruk av den etablerte HPLC-metoden. Både kalibratorer og kontroller ble kontrollert med den etablerte HPLC-metoden, og konsentrasjonen av MPA i disse var akseptable. Kalibreringskurven ved analyse på med MS/MS-metoden var også akseptabel, så forklaringen på dette problemet er usikker, og bør derfor undersøkes nærmere. Dersom problemene med analyse av MPA kommer under kontroll, kan det også være aktuelt å forsøke å inkludere MPAG, da dette vil gi mulighet for undersøkelser av MPA- og MPAG-farmakokinetikk og farmakodynamikk.

5.6.4 Sensitivitet

Det har underveis vært en del problemer med sensitiviteten ved analyse på LC-MS/MS-en som brukes. Dette kan være et generelt problem ved instrumentet, da dette også gjelder andre metoder. Hva som forårsaker disse problemene er usikkert, men det må utredes. En av fordelene med å bruke en LC-MS/MS eller MS generelt, skal jo være at sensitiviteten skal være god, og at man kan måle i lave konsentrasjonsområder med god presisjon, og dermed ha lav deteksjons- og kvantifiseringsgrense.

Noe som forsterker dette problemet er at det i denne metoden skal monitoreres ved ni forskjellige m/z -overganger (syv analytter og to interne standarder). Dette går betydelig utover sensitiviteten, da den tiden som brukes til å måle på hver overgang blir redusert tilsvarende økning i antall overganger det skal monitoreres ved. Ved optimalisering av metoden, bør derfor monitoreringstiden (dwelltime) være tilstrekkelig lang, slik at antall datapunkter per topp i kromatogrammet ligger mellom 10 og 20 (14). Dette vil bedre sensitiviteten, men ikke løse problemet.

5.6.5 Videre planer

Av tidsmessige årsaker og noen uforutsette hendelser underveis, er metoden ved dette hovedfagets slutt ikke ferdigutviklet og validert. For å oppsummere noe av det som er diskutert tidligere, er planene videre:

- Gjenta interferensforsøket i avsnitt 4.1.6, med en annen m/z -overgang for prednisolon enn m/z 361,2 \rightarrow 147,0. Man får da svar på om denne overgangen er for lite spesifikk.
- Kvantifisere kortisol og kortison i det legemiddelfrie plasmaet (Octaplas), og korrigere kalibratorer og kontroller i forhold til dette. Dette må gjøres for hver batch med Octaplas som skal brukes til dette formål.
- Utvide kalibreringsområder til å omfatte de høyeste konsentrasjonene som ble funnet i presisjonsforsøket i avsnitt 4.4.3. Prøvene som ble brukt i dette forsøket vil gjenspeile høye konsentrasjoner av både prednisolon, metylprednisolon og MPA, og vil derfor befinne seg i øvre del av kalibreringsområdet. Etter bestemmelse av LLOQ, skal denne brukes som laveste kalibrator.
- Undersøke hvorvidt omdannelsen fra metylprednisolon til prednison, beskrevet i avsnitt 5.5.1, skjer hos flere pasienter.
- Optimalisere metoden med hensyn til MPA.

Etter at metodeutviklingen er ferdig, man har kontroll over de ulike parametrene, skal det gjennomføres en full validering etter retningslinjer gitt i "Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation", US FDA 2001. Følgende skal valideres:

- Presisjon og nøyaktighet.
- Stabilitet av prøver:
 - Postpreparativ stabilitet
 - Frysing og tining
 - Langtidsstabilitet ved lagring
 - Kortidsstabilitet ved oppbevaring i kjøleskap eller romtemperatur.
- Stabilitet av analytter og interne standarder i stamløsning, ved aktuell lagringstemperatur.
- Stabilitet av kalibratorer og kontroller.
- Kalibreringsmodell
 - LLOQ
 - Presisjon og nøyaktighet
 - Linearitet
- Ekstraksjonsutbytte
- Matrikseffekter

6. Konklusjon

I denne hovedfagsoppgaven har det blitt utviklet en LC-MS/MS-metode for å kvantifisere glukokortikoidene prednisolon, prednison, kortisol, kortison, metylprednisolon og metylprednison i humant plasma. I tillegg er mykofenolsyre (MPA) forsøkt inkludert i metoden.

Plasmaprøvene opparbeides ved hjelp av proteinfelling og væske-væske-ekstraksjon, med påfølgende inndamping. Som interne standarder brukes prednisolon-*d6* og flumetason. Kromatografisk separasjon foregår på en Atlantis[®] HILIC-kolonne, med en mobilfasegradient bestående av vann og 95 % acetonitril, med ammoniumacetat og maursyre.

Som ioniseringsteknikk anvendes elektrospray (ESI+). Protonerte molekyllioner monitoreres ved hjelp av MRM (multippel reaksjonsmonitorering).

Metoden ser lovende ut for kvantifisering av glukokortikoidene, da samtlige kan kvantifiseres i plasmaprøver med konsentrasjoner som er klinisk relevante. Både innen-serie-presisjon og mellom-serie-presisjon er evaluert. Disse er ikke tilfredsstillende, og må forbedres.

Det er foreløpig usikkert hvorvidt metoden er egnet til å analysere MPA, men dette skal arbeides videre med.

Metoden er ved dette hovedfagets slutt ikke helt ferdig og bør optimaliseres. Det skal også gjennomføres full, formell validering av metoden.

Litteraturliste

1. Bogen, B., Munthe, L.A. *Immunologi*, 2.edn. Universitetsforlaget, Oslo, 2002.
2. Kahan, B.D., Ponticelli, C., Kelly, P. *Chapter 7-9*. In: Kahan BD, Ponticelli C, Ponticelli C, eds. *Principles and Practice of Renal Transplantation*. Martin Dunitz Ltd, London, UK, 2000.
3. Bergan, S. (2007) ANx farmakologiske analyser. www.anx.no (29.10.2007)
4. Schimmer, B.P., Parker, K.L. *Chapter 59*. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A, eds. *Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw Hill, New York, NJ,US, 1996.
5. Czock, D., Keller, F., Rasche, F.M., Haussler, U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 61-98.
6. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K. *Pharmacology*, 5.edn. Churchill Livingstone, London, 2003.
7. Draper, N., Stewart, P.M. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* 2005; 186: 251-271.
8. Anonymous (2007). Felleskatalogen. www.felleskatalogen.no (29.10.2007)
9. Vethe, N.T., Bergan, S. Determination of inosine monophosphate dehydrogenase activity in human CD4+ cells isolated from whole blood during mycophenolic acid therapy. *Ther Drug Monit* 2006; 28: 608-613.
10. Allison, A.C., Eugui, E.M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000; 47: 85-118.
11. Vethe, N.T., Bremer, S., Rootwelt, H., Bergan, S. Individuell immunmodulering: Mykofenolat og IMP dehydrogenase. *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift* 2007; 115: 28-30.
12. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E. *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget, Bergen, 2004.

13. Hemstrom, P., Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006; 29: 1784-1821.
14. Niessen W.M.A. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, 3.edn. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, US, 2006.
15. Ardrey, R.E. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley, Chichester, England, 2003.
16. Taylor, P.J. High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Ther Drug Monit* 2005; 27: 689-693.
17. King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000; 11: 942-950.
18. Stokvis, E., Rosing, H., Beijnen, J.H. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 401-407.
19. Frerichs, V.A., Tornatore, K.M. Determination of the glucocorticoids prednisone, prednisolone, dexamethasone, and cortisol in human serum using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004; 802: 329-338.
20. Owen, L.J., Gillingwater, S., Keevil, B.G. Prednisolone measurement in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 105-111.
21. Taylor, R.L., Grebe, S.K., Singh, R.J. Quantitative, highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for detection of synthetic corticosteroids. *Clin Chem* 2004; 50: 2345-2352.
22. Anonymous. *The Merck Index*, 14.edn. Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, US, 2006.
23. Anonymous. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. 2001; U.S. Food and Drug Administration.
24. Antignac, J.P., Le, B.B., Monteau, F., Poulain, F., Andre, F. Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development

of a screening method by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 33-39.

25. Cui, X., Shao, B., Zhao, R., Yang, Y., Hu, J., Tu, X. Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006; 20: 2355-2364.
26. Luo, Y., Uboh, C.E., Soma, L.R., Guan, F.Y., Rudy, J.A., Tsang, D.S. Simultaneous analysis of twenty-one glucocorticoids in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005; 19: 1245-1256.
27. Difrancesco, R., Frerichs, V., Donnelly, J., Hagler, C., Hochreiter, J., Tornatore, K.M. Simultaneous determination of cortisol, dexamethasone, methylprednisolone, prednisone, prednisolone, mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human plasma utilizing liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007.
28. Mandla, R., Line, P.D., Midtvedt, K., Bergan, S. Automated determination of free mycophenolic acid and its glucuronide in plasma from renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2003; 25: 407-414.
29. Taylor, P.J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005; 38: 328-334.

Vedlegg 1

MPA plasmastandarder for HPLC

MW= 320 Mycophenolic Acid "Sigma"

STAML 12340 μM

39,488 mg/10ml metanol

3,9488 mg/ml

	Slutt kons		Løsning A		+ Plasma ¹	----- Løsning A -----				(ønsket voldenne std)
	μM	$\mu\text{g/ml}$	(ml)			STAML (ml)	+	meOH/vann ² 9+1 (ml)	=kons mikro molar	
A1	1,5	0,48	0,5	+	10	0,128	+	49,9	31,5	50
A2	3	0,96	0,5	+	10	0,255	+	49,7	63	50
A3	5	1,6	0,5	+	10	0,425	+	49,6	105	50
A4	10	3,2	0,5	+	10	0,170	+	9,83	210	10
A5	50	16	0,5	+	10	0,851	+	9,15	1050	10
A6	100	32	0,5	+	10	1,702	+	8,30	2100	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.

² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelt volum

Prednisolon plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 360,4 Prednisolon Vetrinal "Riedel-de Haën"

STAML 276 μM *

0,9947 mg/10ml metanol

0,0995 mg/ml

	Slutt kons		Løsning A		+ Plasma ¹	----- Løsning A -----				(ønsket voldenne std)
	μM	$\mu\text{g/ml}$	(ml)			STAML (ml)	+	meOH/vann ² 9+1 (ml)	=kons mikro molar	
A1	0,0278	0,01	0,5	+	10	0,106	+	49,9	0,5838	50
A2	0,0555	0,02	0,5	+	10	0,211	+	49,8	1,1655	50
A3	0,111	0,04	0,5	+	10	0,422	+	49,6	2,331	50
A4	0,2775	0,1	0,5	+	10	0,211	+	9,79	5,8275	10
A5	0,555	0,2	0,5	+	10	0,422	+	9,58	11,655	10
A6	1,11	0,4	0,5	+	10	0,845	+	9,16	23,31	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.

² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelt volum

*Merknad: Opprinnelig stamløsning på 2760 μM ble fortynnet 10 ganger før bruk.

Prednison plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 358,4 Prednison Vetranal "Riedel-de Haën"

STAML 279 µM*0,9999 mg/10ml metanol

0,1 mg/ml

	Slutt kons		Løsning A		+ Plasma ¹ (ml)	----- Løsning A -----				(ønsket voldenne std) (ml)
	µM	µg/ml	(ml)	STAML		meOH/vann ² 9+1 (ml)	=kons mikro molar			
				(ml)				+		
A1	0.0139	0.005	0.5	+	10	0.052	+	49.9	0.2919	50
A2	0.0278	0.01	0.5	+	10	0.105	+	49.9	0.5838	50
A3	0.0557	0.02	0.5	+	10	0.210	+	49.8	1.1697	50
A4	0.0837	0.03	0.5	+	10	0.063	+	9.94	1.7577	10
A5	0.1395	0.05	0.5	+	10	0.105	+	9.90	2.9295	10
A6	0.279	0.1	0.5	+	10	0.210	+	9.79	5.859	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelvolum

*Merknad: Opprinnelig stamløsning på 2790 µM ble fortynnet 10 ganger før bruk.

Kortisol plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 362,5 Kortisol "Riedel-de Haën"

STAML 275 µM*0,9969 mg/10ml metanol

0,0997 mg/ml

						----- Løsning A -----					
	Slutt kons		Løsning A	+ Plasma ¹		STAML	+	meOH/vann ² 9+1	=kons mikro	(ønsket voldenne std)	
	µM	µg/ml	(ml)		(ml)	(ml)		(ml)	molar	(ml)	
A1	0.0138	0,005	0,5	+	10	0,053	+	49,9	0,2898	50	
A2	0.0276	0,01	0,5	+	10	0,105	+	49,9	0,57939	50	
A3	0.0552	0,02	0,5	+	10	0,211	+	49,8	1,15878	50	
A4	0.1104	0,04	0,5	+	10	0,084	+	9,92	2,31756	10	
A5	0.2759	0,1	0,5	+	10	0,211	+	9,79	5,7939	10	
A6	0.5517	0,2	0,5	+	10	0,421	+	9,58	11,5857	10	

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelvolum

*Merknad: Opprinnelig stamløsning på 2750 µM ble fortynnet 10 ganger før bruk.

Kortison plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 360,4 Kortison Vetrinal "Fluka"

STAML 274 µM*0,9875 mg/10ml metanol

0,0987 mg/ml

						----- Løsning A -----				(ønsket voldenne std)
	Slutt kons	µg/ml	Løsning A (ml)	+ Plasma ¹ (ml)	STAML (ml)	meOH/vann ² + 9+1 (ml)	=kons mikro molar			
A1	0,0139	0,005	0,5	+	10	0,053	+	49,9	0,2919	50
A2	0,0278	0,01	0,5	+	10	0,107	+	49,9	0,5838	50
A3	0,0556	0,02	0,5	+	10	0,213	+	49,8	1,1676	50
A4	0,0833	0,03	0,5	+	10	0,064	+	9,94	1,7493	10
A5	0,1388	0,05	0,5	+	10	0,106	+	9,89	2,9148	10
A6	0,2775	0,1	0,5	+	10	0,213	+	9,79	5,8275	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelt volum

*Merknad: Opprinnelig stamløsning på 2740 µM ble fortynnet 10 ganger før bruk.

Metylprednisolon plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 374,5 Metylprednisolon Vetrinal "Riedel-de Haën"

STAML 2660 µM9,9617 mg/10ml metanol

0,9962 mg/ml

						----- Løsning A -----				(ønsket voldenne std)
	Slutt kons	µg/ml	Løsning A (ml)	+ Plasma ¹ (ml)	STAML (ml)	meOH/vann ² + 9+1 (ml)	=kons mikro molar			
A1	0,0533	0,02	0,5	+	10	0,021	+	50,0	1,1193	50
A2	0,267	0,1	0,5	+	10	0,105	+	49,9	5,607	50
A3	1,068	0,4	0,5	+	10	0,422	+	49,6	22,428	50
A4	2,6703	1	0,5	+	10	0,211	+	9,79	56,076	10
A5	5,3405	2	0,5	+	10	0,422	+	9,58	112,15	10
A6	10,681	4	0,5	+	10	0,843	+	9,16	224,3	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelt volum

Metylprednison Plasmastandarder LC-MS/MS

MW= 372,5 Metylprednison "Steraloids"

STAML 224 µM***0,8344 mg/10ml metanol**

0,0834 mg/ml

	Slutt kons		Løsning A		+ Plasma ¹	----- Løsning A -----				(ønsket voldenstd)
	µM	µg/ml	(ml)	(ml)		STAML (ml)	meOH/vann ² + 9+1 (ml)	=kons mikro molar		
A1	0,027	0,01	0,5	+	10	0,126	+	49,9	0,56595	50
A2	0,0538	0,02	0,5	+	10	0,252	+	49,7	1,1298	50
A3	0,1075	0,04	0,5	+	10	0,504	+	49,5	2,2575	50
A4	0,2684	0,1	0,5	+	10	0,252	+	9,75	5,6364	10
A5	0,537	0,2	0,5	+	10	0,503	+	9,50	11,277	10
A6	1,0737	0,4	0,5	+	10	1,007	+	8,99	22,5477	10

¹ Medikamentfritt plasma, frosset, tint og sentrifugert før bruk til standardløsning.² 1 del vann (HPLC-kvalitet) tilsettes metanol til 10-dobbelt volum

*Merknad: Opprinnelig stamløsning på 2240 µM ble fortynnet 10 ganger før bruk.

Ved tillaging av denne stamløsningen ble acetonitril og metanol brukt i forholdet 5:1, dette er årsaken til at konsentrasjonen på denne stamløsningen er på 0,83 g/L, og ikke 1 g/L beskrevet i avsnitt 3.2.2. Ved senere tillaging av denne stamløsningen skal forholdet 4:1 (acetonitril:metanol) brukes.

Plasmakalibratorer/kontroller LC-MS/MS
Glukokortikoider og MPA

	Stamløsning (µl)					MeOH/Vann (2)	Volum (ml)
	Prednison ¹	Prednison ²	Kortisol ²	Kortison ²	Metylprednison	Metylprednison ²	
Løsning A1	106	52	53	53	21	128	50
Løsning A2	211	105	105	107	106	255	50
Løsning A3	422	210	211	213	422	425	50
Løsning A4	211	83	84	84	211	170	10
Løsning A5	422	105	211	106	422	651	10
Løsning A6	845	210	421	213	843	1702	10

	Løsning A (ml)	Plasma (m)(1)	Type løsning
Kalibrator 1	0,5	10	Løsning A1
Kalibrator 2	0,5	10	Løsning A2
Kalibrator 3	0,5	10	Løsning A3
Kalibrator 4	0,5	10	Løsning A4
Kalibrator 5	0,5	10	Løsning A5
Kalibrator 6	0,5	10	Løsning A6
Kontroll 1	0,5	10	Løsning A2
Kontroll 2	0,5	10	Løsning A4
Kontroll 3	0,5	10	Løsning A6

¹ Stamløsning som er fortynnet 10 ganger.
Se egne regneark.

(1): Medkamentivt plasma, trosset, tørt og sentrifugert før bruk.
(2): 1 del vann og 9 deler metanol

	Konsentrasjon (µg/L) i kalibrator/kontroll					
	Prednison	Prednison	Kortisol	Kortison	Metylprednison	MPA (mg/L)
Kalibrator 1	10	5	5	5	20	0,48
Kalibrator 2	20	10	10	10	100	0,96
Kalibrator 3	40	20	20	20	400	1,6
Kalibrator 4	100	30	40	30	1000	3,2
Kalibrator 5	200	50	100	50	2000	16
Kalibrator 6	400	100	200	100	4000	32
Kontroll 1	20	10	10	10	100	0,96
Kontroll 2	100	30	40	30	1000	3,2
Kontroll 3	400	100	200	100	4000	32

Vedlegg 2

Prednisolon- og prednisonkonsentrasjoner hos pasient 1-3

Tid etter dose (timer)	Pasient 1		Pasient 2		Pasient 3	
	Konsentrasjon (µg/L)		Konsentrasjon (µg/L)		Konsentrasjon (µg/L)	
	Prednisolon	Prednison	Prednisolon	Prednison	Prednisolon	Prednison
0,0	150,0	18,2	45,5	3,3	135,5	21,2
0,5	203,9	15,3	294,8	14,4	360,8	29,2
1,0	179,1	11,7	443,8	38,6	417,0	17,6
1,5	218,0	17,8	425,5	34,8	347,9	24,0
2,0	316,5	19,3	317,9	54,3	348,3	23,9
3,0	357,5	27,2	334,9	48,9	375,2	38,2
4,0	339,6	37,6	295,2	60,0	258,4	19,9
5,0	434,5	31,6	235,1	55,2	130,0	9,7
6,0	285,0	27,2	180,1	39,6	238,7	29,6
8,0	239,9	28,8	142,1	32,0	136,0	20,1
10,0	142,1	21,4	65,9	16,3	84,6	10,1
12,0	38,0	130,8	19,2	0,9	55,7	9,0

Kortisol- og kortisonkonsentrasjoner hos pasient 1-3

Tid etter dose (timer)	Pasient 1		Pasient 2		Pasient 3	
	Konsentrasjon (µg/L)		Konsentrasjon (µg/L)		Konsentrasjon (µg/L)	
	Kortisol	Kortison	Kortisol	Kortison	Kortisol	Kortison
0,0	0,0	1,8	6,8	0,0	0,0	0,0
0,5	10,5	2,2	7,5	2,2	0,0	4,5
1,0	0,5	4,4	14,5	4,0	0,0	5,5
1,5	0,0	2,5	16,0	2,0	34,1	14,4
2,0	5,9	5,5	8,1	0,5	0,0	2,3
3,0	1,6	5,4	6,8	0,5	0,0	0,5
4,0	0,0	0,7	16,7	1,6	9,6	0,0
5,0	8,1	0,0	9,4	1,2	12,5	0,0
6,0	4,5	1,0	11,0	0,5	0,0	0,9
8,0	0,0	0,0	8,6	1,9	0,0	0,0
10,0	0,0	0,5	15,3	0,0	0,0	0,0
12,0	0,0	0,0	9,8	0,0	0,0	0,0

Kortisol- og kortisonkonsentrasjoner hos to friske, frivillige personer (A og B)

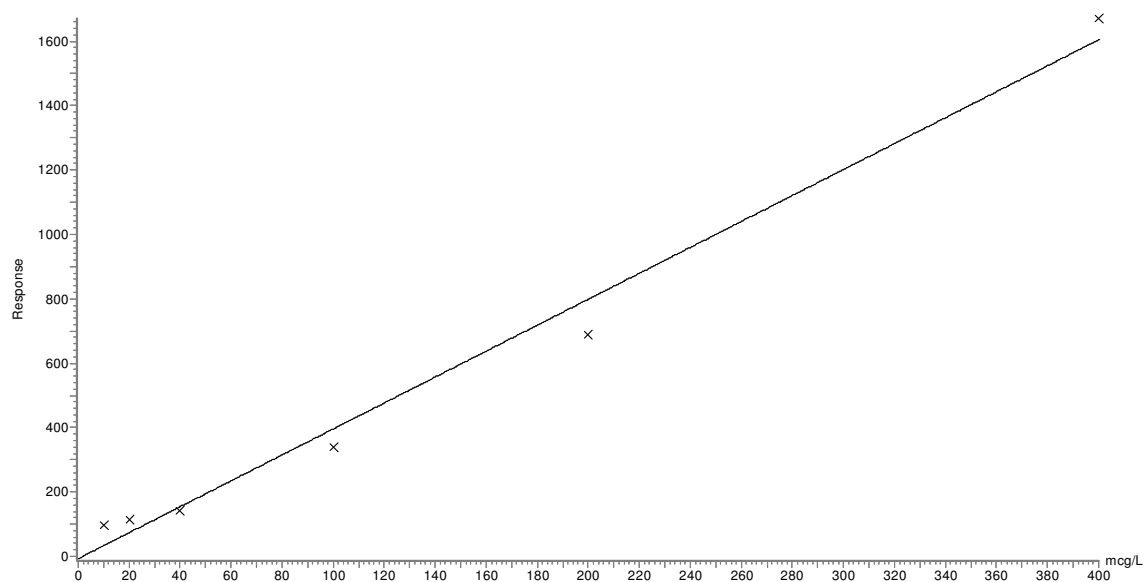
Klokkeslett:	Person A		Person B	
	Konsentrasjon (µg/L)		Konsentrasjon (µg/L)	
	Kortisol	Kortison	Kortisol	Kortison
08.00	57,7	8,7	38,7	2,5
10.00	98,6	35,0	66,5	20,0
12.00	62,5	22,5	40,9	4,9
14.00	45,6	3,1	27,1	6,3
16.00	53,6	18,4	63,4	11,0
18.00	15,4	1,7	0,0	2,7
20.00	0,0	1,0	0,0	0,3

Figurene 4-7, 4-8 og 4-9 er basert på disse tre tabellene.

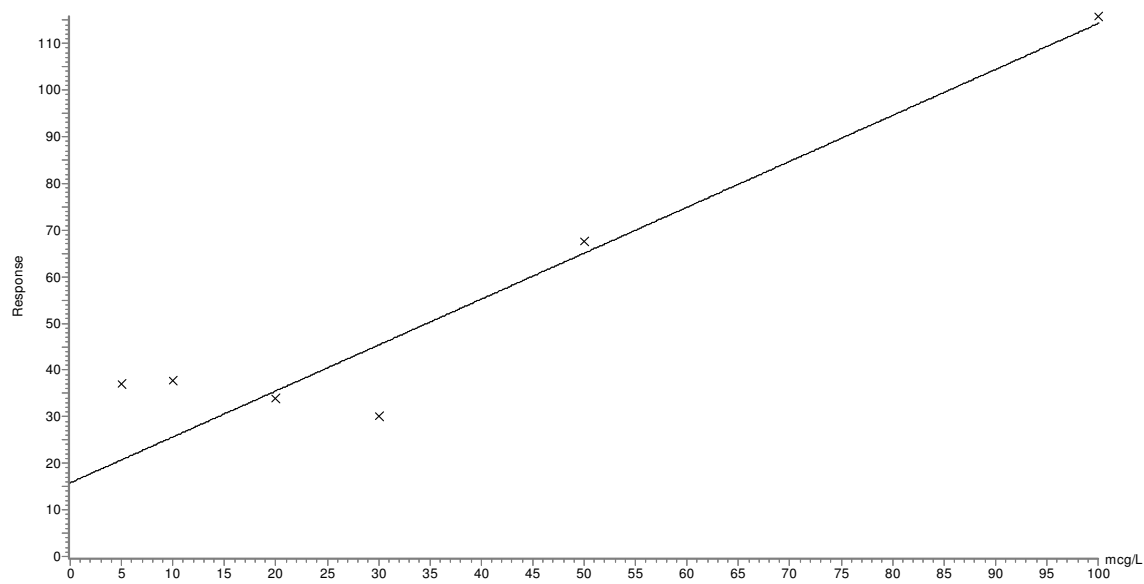
Vedlegg 3

Tilfeldig utvalgte kalibreringskurver for alle analyttene, fra en av analyseseriene i presisjonsforsøket.

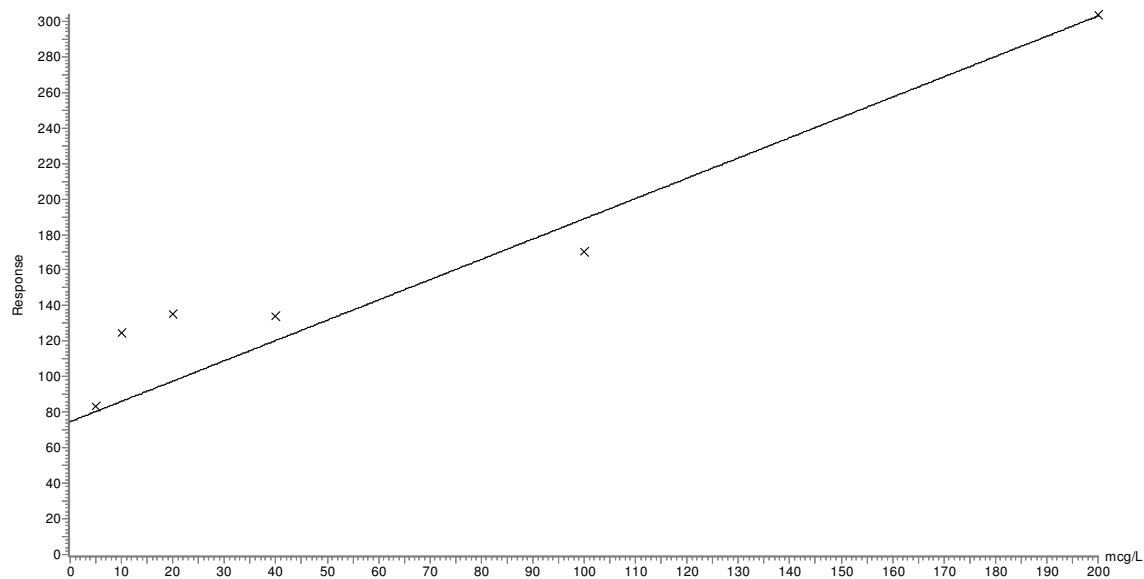
Compound name: Prednisolone
Correlation coefficient: $r = 0.993877$, $r^2 = 0.987791$
Calibration curve: $4.02882 \cdot x + -6.74595$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc. / IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



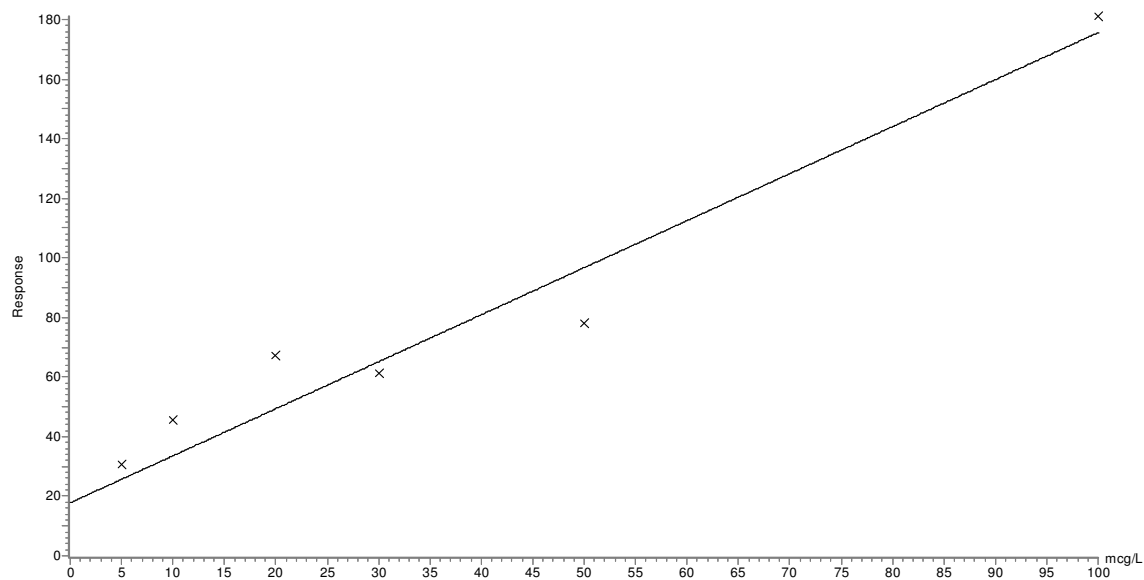
Compound name: Prednisone
Correlation coefficient: $r = 0.941765$, $r^2 = 0.886921$
Calibration curve: $0.984538 \cdot x + 15.8161$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc. / IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



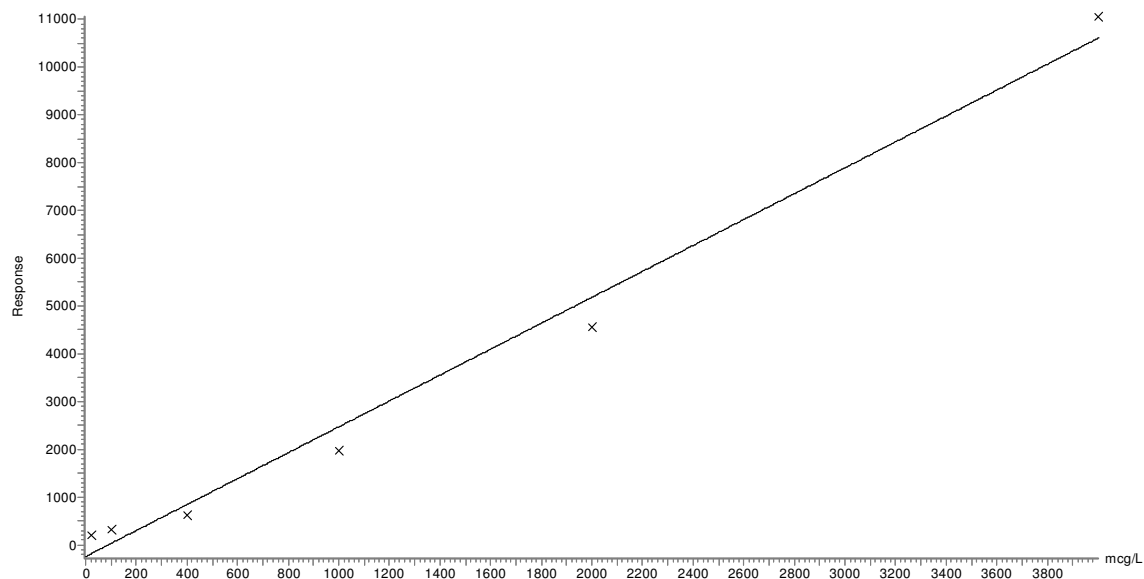
Compound name: Cortisol
Correlation coefficient: $r = 0.906899$, $r^2 = 0.822466$
Calibration curve: $1.14149 \cdot x + 74.6894$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc./ IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



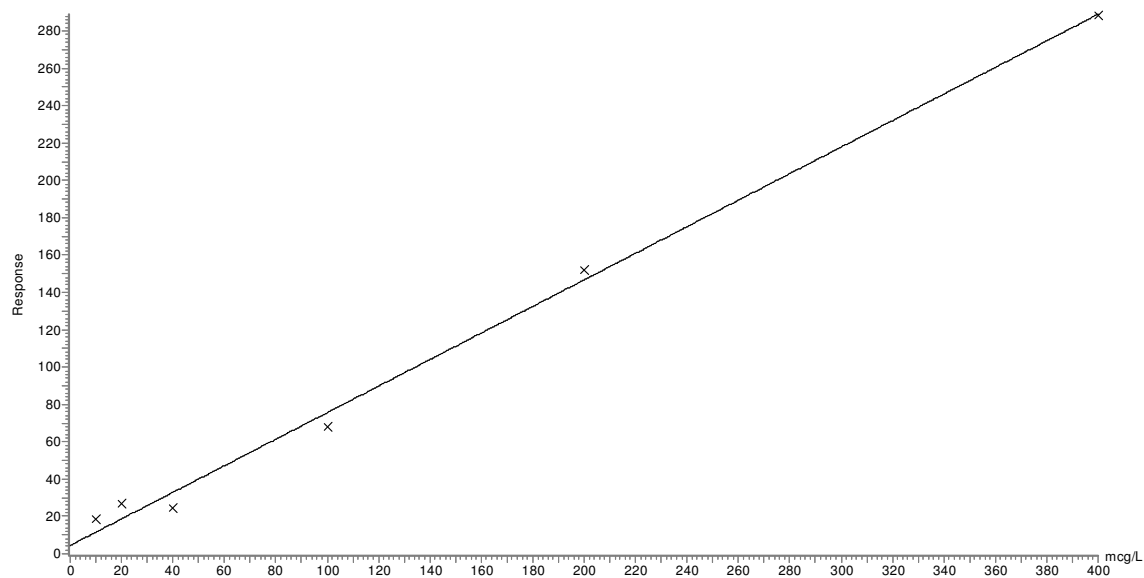
Compound name: Cortisone
Correlation coefficient: $r = 0.968854$, $r^2 = 0.938677$
Calibration curve: $1.57918 \cdot x + 17.7494$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc./ IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Methylprednisolone
Correlation coefficient: $r = 0.993984$, $r^2 = 0.988005$
Calibration curve: $2.7112 \cdot x + -240.437$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc./IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Methylprednisolone
Correlation coefficient: $r = 0.997709$, $r^2 = 0.995423$
Calibration curve: $0.71151 \cdot x + 4.39228$
Response type: Internal Std (Ref 9), Height * (IS Conc./IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: Mycophenolic acid
Correlation coefficient: $r = 0.994841$, $r^2 = 0.989708$
Calibration curve: $1683.48 \cdot x + 107.468$
Response type: Internal Std (Ref 8), Height * (IS Conc./IS Height)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

